

**ANILDO CUNHA JUNIOR**

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DA ESPÉCIE VEGETAL**

***Polygala sabulosa* A. W. Bennett (POLYGALACEAE)**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre em Química.

Curso de Pós-Graduação em Química,  
Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

**FLORIANÓPOLIS**

**2002**

**Constituintes Químicos da Espécie Vegetal**  
***Polygala sabulosa* A. W. Bennett (Polygalaceae)**

**Anildo Cunha Junior**

Esta dissertação foi julgada e aprovada pelo orientador e demais membros da banca examinadora.

---

Moacir Geraldo Pizzolatti  
Orientador

---

Faruk Nome  
Coordenador

Banca examinadora:

---

Alexsandro Branco  
Depto. Farmácia – UFBA

---

Marina Uieara  
Depto. de Química – UFSC

---

Miguel S. B. Caro  
Depto. de Química – UFSC

*Dedico este trabalho...*

*...à querida Cynthia pelos mais puros e verdadeiros  
sentimentos de amor, carinho, amizade e apreço.  
Que sejam eternos os nossos momentos de  
felicidade.*

*...aos meus pais, Anildo e Marta, e ao meu irmão,  
André, pelos inestimáveis sentimentos de amor,  
carinho e amizade e pelo permanente incentivo.*

*...aos meus sogros, Isaías e Mauricéa, e à Viviane,  
pelo carinho, amizade e permanente incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Em especial, ao Professor Moacir Geraldo Pizzolatti por sua notável orientação, por todos os ensinamentos transmitidos e, sobretudo, por sua valiosa e inestimável amizade.

Aos Professores Alexsandro Branco, Inês M. C. Brighente e Maria da Graça Nascimento pela valiosa amizade e pelos indispensáveis conselhos que muito contribuíram para minha formação.

Aos Professores Miguel S. B. Caro e Luiz A. dos Santos Madureira pela cooperação na obtenção dos espectros.

Ao Professor Franco Delle Monache pela cooperação na obtenção dos espectros e colaboração nas elucidações estruturais.

Aos Professores Mário Steindel e Edmundo C. Grisard pela cooperação na realização dos ensaios de atividade tripanomicida.

Ao Professor Adair R. S. Santos pela cooperação na realização dos ensaios de atividade antinociceptiva.

À Professora Marina Uieara pelas valiosas sugestões que muito contribuíram para elaboração deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Wagner S. Pereira, Luiz G. Verdi, Francisco Moreira, Gilberto D. Luz, Ana Beatriz Montanher, Ana Karina Timbola, Rodrigo Cristiano, Valmor Coutinho, Okima H. Huaita, Carina Damaso, Juliana Bastos, Luiz Fernando da Silva, Pedro da Cunha e Priscila de Bem, pela amizade e companheirismo durante a realização dos trabalhos experimentais.

Aos meus grandes amigos, Eliandra de Sousa, Rusiene M. de Almeida, Fernando Molin, Annelise Casellato, Cristiano Mora, Ivanise M. Rizzatti, Marcelo A. Moreira, Andréia N. Fernandes, Fabrícia Amorim, Alexandra Gelslechter e Maria Amélia B. Carlos. Que o mais sincero sentimento de amizade esteja para sempre guardado em nossos corações.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

A Deus, por todas as virtudes recebidas.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Um pouco do metabolismo primário em plantas.....	1
1.2 Os produtos do metabolismo secundário de plantas.....	6
1.2.1 Conceito e Funções biológicas .....	6
1.2.2 Biogênese .....	7
1.2.2.1 A via do acetato-malonato.....	7
1.2.2.2 A via do ácido mevalônico .....	9
1.2.2.3 A via do ácido shiquímico .....	11
1.2.2.4 Metabólitos secundários contendo o Nitrogênio ou Enxofre .....	13
1.2.3 Importância.....	16
1.3 Considerações gerais sobre a espécie vegetal	
<i>Polygala sabulosa</i> (Polygalaceae).....	19
1.4 Constituintes químicos do gênero <i>Polygala</i> (Polygalaceae).....	20
<b>2 ESTIRIL-LACTONAS.....</b>	<b>30</b>
2.1 Introdução .....	30
2.2 Conceito e Classificação .....	32
2.3 Biogênese .....	33
2.4 O heterociclo 2H-piran-2-ona .....	34
2.4.1 Introdução.....	34
2.4.2 Estrutura, Estabilidade e Propriedades espectroscópicas.....	34

<b>3</b>	<b>OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>38</b>
3.1	Objetivos .....	38
3.1.1	Objetivo geral .....	38
3.1.2	Objetivos específicos .....	38
3.2	Justificativas .....	39
3.2.1	Contribuição quimiotaxonômica .....	39
3.2.2	A busca por novos modelos de agentes antichagásicos .....	39
3.2.3	A busca por novos modelos de fármacos analgésicos .....	42
<b>4</b>	<b>SEÇÃO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>43</b>
4.1	Estudo fitoquímico sistemático .....	43
4.1.1	Materiais e Métodos.....	43
4.1.2	Coleta e Identificação da planta.....	44
4.1.3	Procedimento padrão de cromatografia por adsorção em coluna.....	44
4.1.4	Procedimento padrão de isolamento .....	45
4.1.5	Preparação do extrato bruto de <i>P. sabulosa</i> .....	45
4.1.6	Preparação das frações solúveis de <i>P. sabulosa</i> (pré-fracionamento A) .....	45
4.1.7	Preparação das frações solúveis de <i>P. sabulosa</i> (pré-fracionamento B) .....	46
4.1.8	Isolamento dos constituintes químicos da fração solúvel em diclorometano obtida no pré-fracionamento A.....	46
4.1.9	Isolamento dos constituintes químicos da fração solúvel em acetato de etila obtida no pré-fracionamento A.....	47
4.1.10	Isolamento dos constituintes químicos da fração solúvel em etanol obtida no pré-fracionamento B.....	48
4.1.11	Caracterização dos constituintes químicos.....	52
4.2	Ensaio biológico .....	55
4.2.1	Atividade tripanomicida.....	55
4.2.2	Atividade antinociceptiva.....	56

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
5.1	Estudo fitoquímico sistemático de <i>P. sabulosa</i> (Polygalaceae).....	57
5.1.1	24-etil-5 $\alpha$ -colest-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (1).....	58
5.1.2	7-(3',3'-dimetilaliloxi)-6-metoxicumarina (2) .....	61
5.1.3	Três dihidroestiril-lactonas (3, 4 e 5).....	65
5.1.4	Três estiril-lactonas (6, 7 e 9).....	75
5.1.5	Uma nova estiril-lactona (8).....	79
5.1.6	Protohipericina (10) .....	84
5.1.7	5,7,4'-trihidroxi-flavona (11) .....	86
5.1.8	3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona (12) .....	88
5.1.9	3-O-( $\beta$ -glicopiranosil)-5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavona (13).....	90
5.2	Ensaio biológicos .....	94
5.2.1	Atividade tripanomicida.....	94
5.2.2	Atividade antinociceptiva.....	96
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>99</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA... ..</b>	<b>102</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Seqüência reacional que constitui o Ciclo de Calvin.....	3
<b>Figura 2</b>	Biossíntese do amido a partir do gliceraldeído-3-fosfato.....	4
<b>Figura 3</b>	O processo de glicólise e a biogênese da acetil-coenzima A .....	5
<b>Figura 4</b>	Expressão da gênese dos policetídeos.....	8
<b>Figura 5</b>	Expressão da gênese das acetogeninas.....	8
<b>Figura 6</b>	Expressão da gênese do pirofosfato de isopentila e do pirofosfato de 3,3- dimetilalila.....	9
<b>Figura 7</b>	Biossíntese dos compostos terpenóides.....	10
<b>Figura 8</b>	Expressão da gênese do ácido shiquímico.....	11
<b>Figura 9</b>	Expressão da gênese do ácido fenilpirúvico, da fenilalanina e do ácido cinâmico.....	12
<b>Figura 10</b>	Os produtos da rota do ácido shiquímico.....	14
<b>Figura 11</b>	Aminoácidos que participam da biossíntese dos alcalóides.....	15
<b>Figura 12</b>	<i>Polygala sabulosa</i> A. W. Bennett.....	20
<b>Figura 13</b>	Goniotalamina: a primeira estiril-lactona isolada de fonte natural.....	30
<b>Figura 14</b>	Exemplos representativos de estiril-lactonas de espécies vegetais .....	31
<b>Figura 15</b>	Classificação das estiril-lactonas.....	32
<b>Figura 16</b>	Hipótese sobre a biossíntese das estiril-lactonas.....	33
<b>Figura 17</b>	Formas ressonantes do heterociclo 2 <i>H</i> -piran-2-ona.....	34
<b>Figura 18</b>	Ciclos que asseguram a circulação do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> nos ecossistemas .....	41
<b>Figura 19</b>	Variações do deslocamento químico para os átomos C-5 e C-8 de <b>2a</b> e <b>2b</b> .....	64
<b>Figura 20</b>	Unidades que compõem a estrutura molecular do composto <b>3</b> .....	67
<b>Figura 21</b>	Variações do deslocamento químico para os átomos C-8 e C-9 de <b>3</b> , <b>4</b> e <b>5</b> .....	73
<b>Figura 22</b>	A) Cromatograma do combinado das frs. 80-97 obtido por CGAR; B) EMIE relacionado ao pico com <i>T<sub>r</sub></i> igual a 23.63 minutos.....	80
<b>Figura 23</b>	Classificação das quinonas.....	84
<b>Figura 24</b>	Expressão da gênese do protohypericin ( <b>10</b> ) e do hypericin ( <b>10a</b> ) .....	85



<b>Figura 25</b>	Efeito do extrato bruto e frações solúveis <i>P. sabulosa</i> (Polygalaceae) na nocicepção causada pelo ácido acético em camundongos.....	97
<b>Figura 26</b>	Efeito dos compostos 3-5 e 9 isolados de <i>P. sabulosa</i> (Polygalaceae) na nocicepção causada pelo ácido acético em camundongos.....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Xantonas isoladas de espécies do gênero <i>Polygala</i> (Polygalaceae).....	21
<b>Tabela 2</b>	Estimativa para as distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação do heterociclo 2 <i>H</i> -piran-2-ona 36 .....	35
<b>Tabela 3</b>	Propriedades espectroscópicas do heterociclo 2 <i>H</i> -piran-2-ona .....	36
<b>Tabela 4</b>	Dados de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz) e RMN <sup>13</sup> C (75 MHz) dos compostos <b>3-5</b> .....	74
<b>Tabela 5</b>	Dados de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz) e RMN <sup>13</sup> C (75 MHz) dos compostos <b>6-9</b> .....	83
<b>Tabela 6</b>	Dados de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz) dos compostos <b>11-13</b> .....	93
<b>Tabela 7</b>	Efeito do extrato bruto e frações solúveis ensaiados frente à forma de cultura epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	94
<b>Tabela 8</b>	Efeito do extrato bruto e frações solúveis ensaiados frente à forma tripomastigota sangüínea de <i>T. cruzi</i> .....	95
<b>Tabela 9</b>	Efeito dos compostos <b>1, 2 e 4</b> isolados de <i>P. sabulosa</i> ensaiados frente à forma de cultura epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\phi$	Diâmetro (cm)
Ac	Radical acetil
AcOEt	Acetato de etila
Api	Radical $\beta$ -D-apiofuranosila
Ara	Radical $\alpha$ -L-arabinosila
CC	Cromatografia por adsorção em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
CGAR-EM	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massas
CIT	Cromatograma de íons totais
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização — $\theta=135^\circ$ : sinais de $\text{CH}_2$ em fase oposta aos de CH e $\text{CH}_3$ )
$\text{DI}_{50}$	Dose inibitória 50%
$\text{DL}_{50}$	Dose letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
$\text{DMSO-}d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
EMIE	Espectrometria de Massas por Impacto Eletrônico a 70 eV
EtOH	Etanol
eV	eletron-Volt
FM	Fórmula Molecular
Gal	Radical $\beta$ -D-galactopiranosila
Glc	Radical D-glicopiranosila
$h$	Altura (cm)
I.V.	Espectrometria no Infravermelho
IM	Inibição máxima
$J$	Constante de acoplamento (Hz)

MHz	Mega Hertz
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
P	PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
PF	Ponto de Fusão
ppm	partes por milhão
RDA	Retro Diels-Alder
Rha	radical L-ramnopiranosila
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>T<sub>r</sub></i>	Tempo de retenção

## RESUMO

Este trabalho apresenta o estudo fitoquímico sistemático da espécie vegetal *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (Polygalaceae), uma pequena erva comumente chamada de “timuto-pinheirinho” que se desenvolve no Planalto Meridional Sul e que têm sido utilizada na medicina popular como anestésico local e expectorante.

A aplicação de métodos convencionais de separação às frações do extrato bruto de *P. sabulosa* solúveis em diclorometano, acetato de etila e etanol conduziu ao isolamento de treze compostos, identificados como 24-etil-5 $\alpha$ -colesta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (**1**), 7-(3',3'-dimetilaliloxi)-6-metoxicumarina (**2**), 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-dihidroestiril)-2*H*-piran-2-ona (**3**), 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-14-metoxi-dihidroestiril)-2*H*-piran-2-ona (**4**), 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-10,14-dimetoxi-dihidroestiril)-2*H*-piran-2-ona (**5**), 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-estiril)-2*H*-piran-2-ona (**6**), 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-14-metoxi-estiril)-2*H*-piran-2-ona (**7**), 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-10,14-dimetoxi-estiril)-2*H*-piran-2-ona (**8**), 4-metoxi-6-(11,12-dimetoxi-estiril)-2*H*-piran-2-ona (**9**), protohipericina (**10**), 5,7,4'-trihidroxiflavona (**11**), 3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona (**12**) e 3-*O*-( $\beta$ -D-glicopiranosil)-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona (**13**). A determinação estrutural destas substâncias, realizada a partir dos seus dados espectrais de infravermelho, massas e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono-13, é discutida. A estiril-lactona **8**, previamente caracterizada por CGAR-EM, foi identificada em mistura com o composto **7** e está sendo descrita como um novo produto natural. O esteroide **1** e os flavonóides **11**, **12** e **13** são descritos pela primeira vez como constituintes químicos de *Polygala sabulosa*.

A avaliação das atividades tripanomicida e antinociceptiva do extrato bruto, frações solúveis e compostos puros de *Polygala sabulosa*, conduzidas respectivamente por bioensaio em meio de cultura contra as formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* e pelo modelo de dor induzida com ácido acético, também é informada.

## ABSTRACT

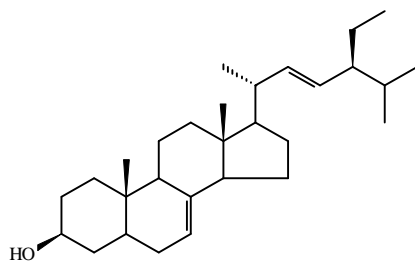
This work presents the sistematic phytochemical study of *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (Polygalaceae), a small herbal commonly called “timuto-pinheirinho” that grows on Southern Meridional Hightlands, wich has been used in popular medicine as local anesthetic and expectorant.

Conventional separation methods of solubles fractions of crude extract from *P. sabulosa* in dichloromethane, ethyl acetate and ethanol led to an isolation of thirteen compounds, identified as 24-ethyl-5 $\alpha$ -cholesta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (**1**), 7-(3',3'-dimethylallyloxy)-6-methoxycoumarin (**2**), 4-methoxy-6-(11,12-methylenedioxy-dihydrostyryl)-2*H*-pyran-2-one (**3**), 4-methoxy-6-(11,12-methylenedioxy-14-methoxy-dihydrostyryl)-2*H*-pyran-2-one (**4**), 4-methoxy-6-(11,12-methylenedioxy-10,14-dimethoxy-dihydrostyryl)-2*H*-pyran-2-one (**5**), 4-methoxy-6-(11,12-methylenedioxy-styryl)-2*H*-pyran-2-one (**6**), 4-methoxy-6-(11,12-methylenedioxy-14-methoxy-styryl)-2*H*-pyran-2-one (**7**), 4-methoxy-6-(11,12-methylenedioxy-10,14-dimethoxy-styryl)-2*H*-pyran-2-one (**8**), 4-methoxy-6-(11,12-dimethoxy-styryl)-2*H*-pyran-2-one (**9**), protohypericin (**10**), 5,7,4'-trihydroxyflavone (**11**), 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone (**12**) e 3-*O*-( $\beta$ -D-glicopiranosil)-5,7,3',4'-pentahydroxyflavone (**13**). The styryl-lactone **8**, previosly characterized by HRGC-MS, was identified in mixture with the compound **7** and is described as a new natural product. The sterol **1** and the flavonoids **11**, **12** e **13** are described as chemical constituents of *Polygala sabulosa* at first time.

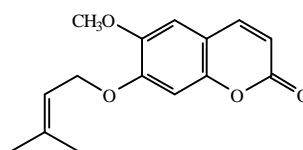
An evaluation of trypanocidal and antinociceptive activities of crude extract, solubles fractions and pure compounds, performed respectively by bioassays in medium culture against epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and by acetic acid induced pain model, is also reported.

# CONSTITUINTES QUÍMICOS DA ESPÉCIE VEGETAL

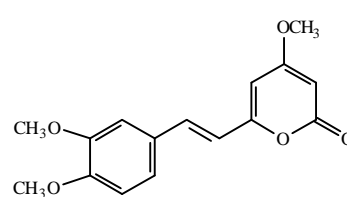
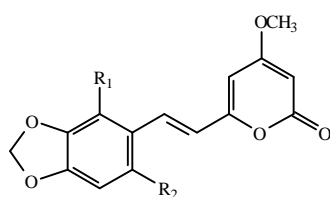
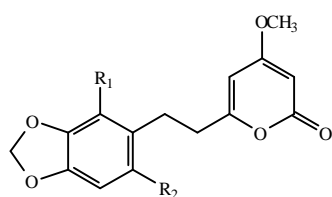
## *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (POLYGALACEAE)



**1**



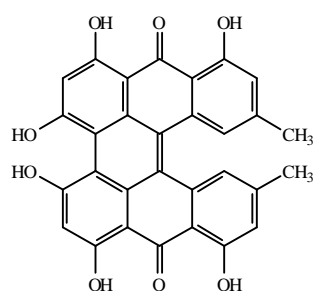
**2**



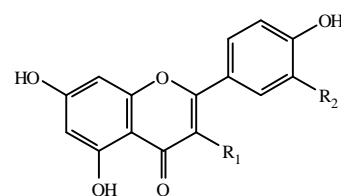
**9**

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>3</b>	H	H
<b>4</b>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>5</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>6</b>	H	H
<b>7</b>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>8</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>



**10**



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>11</b>	H	H
<b>12</b>	OH	OH
<b>13</b>	OGlc	OH

# **1. INTRODUÇÃO**

As células dos organismos vivos — bactérias, líquens, fungos, plantas, insetos e animais superiores — são extraordinários sítios de complexa atividade biossintética que resulta na produção de compostos orgânicos com os mais variados arranjos moleculares<sup>(1)</sup>. Essas substâncias naturais contribuem diretamente para a manutenção e o desenvolvimento da vida e podem ser classificadas de acordo com alguns critérios como metabólitos primários ou secundários.

Seria, então, um desperdício não se beneficiar da incrível capacidade de produção dos laboratórios vivos celulares. De fato, o estudo dessas biomoléculas, com o propósito de compreender suas origens, funções e utilidades para a humanidade, constitui-se em uma fascinante e promissora área de investigação científica.

O texto a seguir irá concentrar-se no estudo dos produtos do metabolismo secundário de espécies vegetais, tendo a preocupação de enfatizar as suas funções nos sistemas biológicos, os seus principais aspectos ecológicos e biogénéticos e as suas aplicações. Outrora, seria inconveniente iniciar tal explanação sem antes apresentar uma breve descrição acerca de algumas das principais transformações ao nível do metabolismo primário em plantas, tendo em vista a íntima relação biossintética entre metabólitos primários e secundários.

## **1.1. Um pouco do metabolismo primário em plantas**

Como em toda e qualquer forma de vida, o metabolismo primário de plantas é um complexo, dinâmico e equilibrado ciclo de transformações bioquímicas que utilizam componentes abundantes na natureza, tais como a água, o dióxido de carbono, o nitrogénio, os compostos de fósforo e os sais inorgânicos, para obtenção de substâncias necessárias às diversas atividades fisiológicas. Os produtos do metabolismo primário estão distribuídos em todos os organismos do Reino Vegetal e apresentam moléculas relativamente simples.

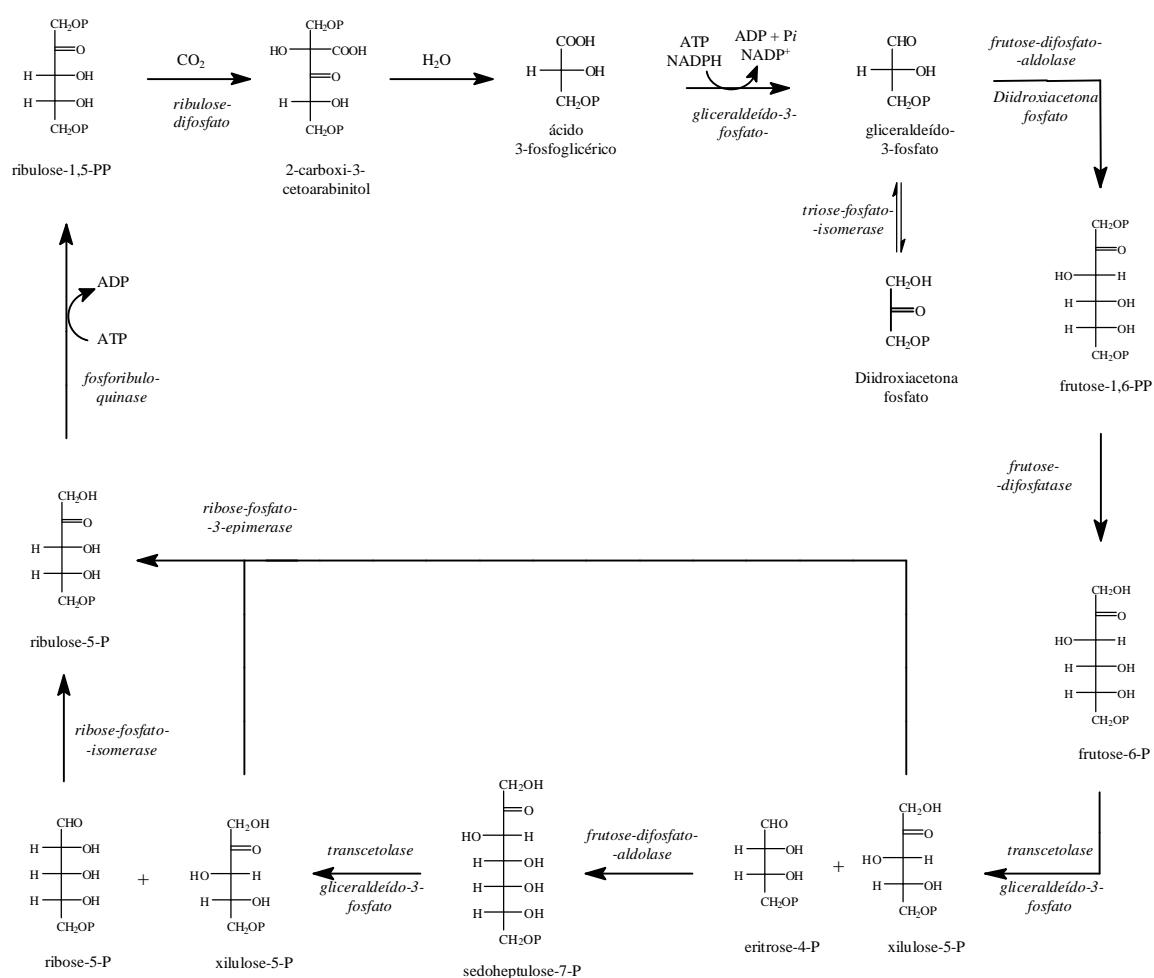


São eles os pigmentos, carboidratos e derivados, lipídios, ácidos orgânicos de baixo peso molecular e derivados, aminoácidos, amidas, proteínas e ácidos nucleicos. Nas plantas, cada um desses metabólitos possui funções específicas, destacando-se a atuação nos processos de captação de radiação, assimilação e transporte de nutrientes, proteção externa, respiração e reprodução. Além disso, alguns se apresentam como materiais de partida das rotas biossintéticas que levam aos produtos do metabolismo secundário.

A etapa inicial do metabolismo primário é a fotossíntese, um surpreendente processo pelo qual os vegetais produzem os carboidratos a partir da redução do dióxido de carbono e oxidação da água. Em sua primeira fase, chamada de etapa luminosa, atuam em cooperação um grande número de pigmentos e proteínas transportadoras de elétrons para a absorção da radiação eletromagnética e condução desta energia até os centros reacionais, onde será necessária para modulação dos equilíbrios entre as espécies  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  e  $\text{ADP}/\text{ATP}$ , que são participantes ativos na etapa seguinte. Dando seqüência, acontece a etapa sem luz, onde ocorrem inúmeras reações químicas de complexidade e especificidade extraordinárias.

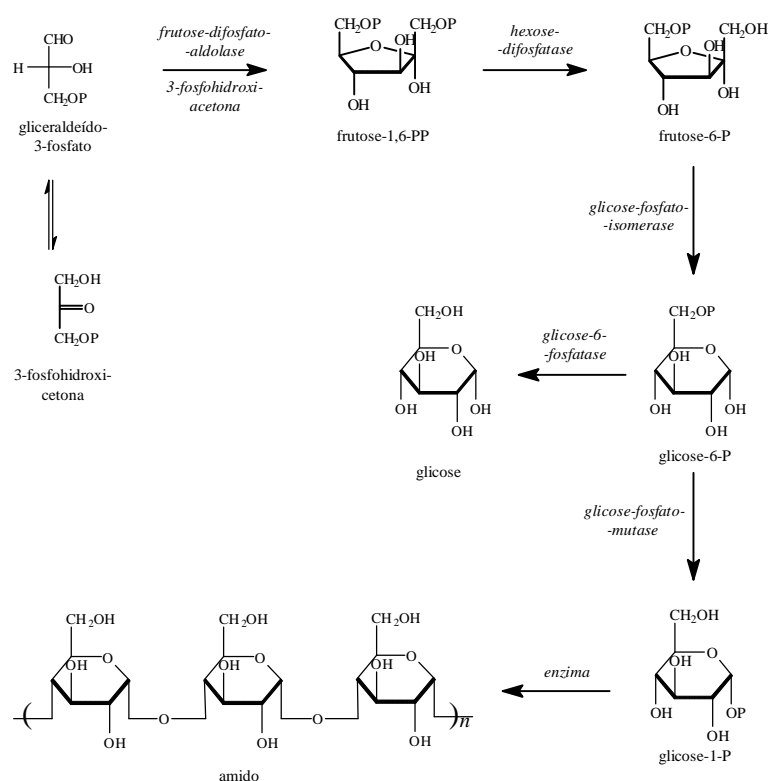
A seqüência reacional que rege a etapa escura da fotossíntese é chamada de Ciclo de Calvin (Fig. 1). Este ciclo encerra três passos: carboxilação, redução e regeneração. A carboxilação, também chamada de fixação do carbono, ocorre através da incorporação de  $\text{CO}_2$  pela ribulose-1,5-difosfato (Rib-1,5-PP) catalisada pela enzima *ribulose-difosfato-carboxilase*. Como resultado é gerado o 2-carboxi-3-cetoarabinitol, um intermediário instável que sofre hidrólise e fornece duas moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA). Em seguida, sucede-se a redução, onde este último ácido orgânico é convertido a gliceraldeído-3-fosfato por ação da ATP, do NADPH e da enzima *gliceraldeído-3-fosfato-deidrogenase*. Para que a fixação do carbono seja um processo contínuo é necessário a regeneração da Rib-1,5-PP, que acontecerá como etapa complementar da via de Calvin. A partir da enolização do gliceraldeído-3-fosfato é obtido a 3-fosfohidroxicetona, que sofre condensação aldólica com uma outra molécula do aldeído para dar a frutose-1,6-difosfato, a qual na seqüência é hidrolisada a frutose-6-fosfato. Com a mediação da enzima *transcetolase*, uma unidade de dois carbonos é transferida da frutose-6-fosfato para uma terceira molécula de gliceraldeído-3-fosfato resultando em eritrose-4-fosfato e xilulose-5-fosfato. A eritrose-4-fosfato combina-se com 3-fosfohidroxicetona para produzir

sedoheptulose-7-fosfato, que por sua vez doa uma unidade de dois carbonos a uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato resultando na formação de ribose-5-fosfato e xilulose-5-fosfato. As duas moléculas de xilulose-5-fosfato dão origem a ribulose-5-fosfato por epimerização e uma outra molécula de ribulose-5-fosfato é formada por isomerização da ribose-5-fosfato. Finalmente, ribulose-5-fosfato é fosforilada com ATP para regenerar o aceptor de CO<sub>2</sub>, no caso a Rib-1,5-PP<sup>(2-4)</sup>.



**Figura 1.** Sequência reacional que constitui o Ciclo de Calvin.

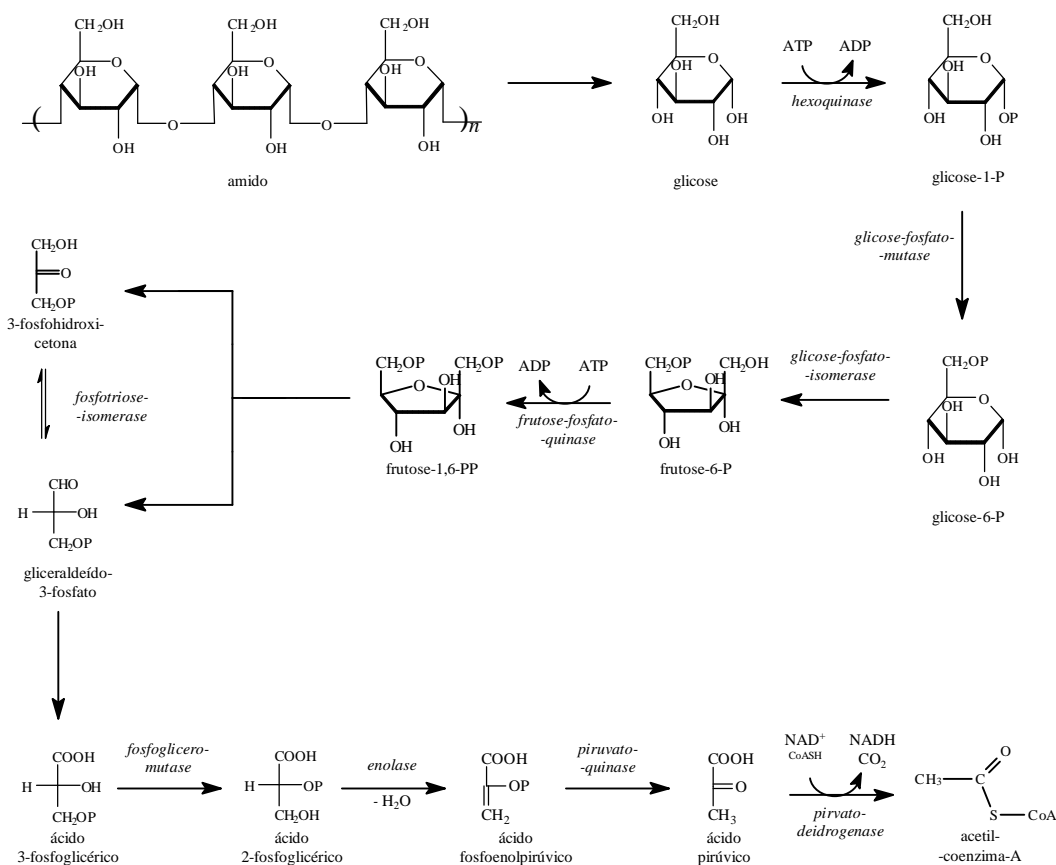
O gliceraldeído-3-fosfato gerado em excesso na via de Calvin serve também como material de partida para biossíntese da glicose-6-fosfato, que pode sofrer tanto hidrólise catalisada pela enzima *glicose-6-fosfatase* para produzir a glicose, quanto isomerização por ação da enzima *fosfoglicomutase* para originar a glicose-1-fosfato. Esta última hexose é vista como precursor biossintético do amido, o principal produto do processo de fotossíntese, que será armazenado em células e tecidos vegetais especializados (Fig. 2). É sempre interessante lembrar que a glicose-6-fosfato e a frutose-6-fosfato serão convertidas por enolização enzimática a muitos outros carboidratos simples, os quais surgem como novos monômeros para composição de outros inúmeros polissacarídeos<sup>(4)</sup>.



**Figura 2.** Biossíntese do amido a partir do gliceraldeído-3-fosfato.

Através da via glicolítica (seqüência reacional inversa do processo de fotossíntese) o amido estocado pode ser degradado sob condições aeróbicas a ácido fosfoenolpirúvico e em seqüência esta triose é convertida a ácido pirúvico por ação da enzima *piruvato-quinase*. A

descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico leva à formação da acetil coenzima-A (Fig. 3), necessária a inúmeros processos primários.



**Figura 3.** O processo de glicólise e a biogênese da acetil coenzima-A.

Das reações bioquímicas primárias apresentadas até aqui, três produtos são considerados fundamentais para a biogênese dos metabólitos secundários: a eritrose-4-fosfato, o ácido fosfoenolpirúvico e a acetil coenzima-A.

## **1.2. Os produtos do metabolismo secundário de plantas**

### **1.2.1. Conceito e Funções biológicas**

Ao longo do processo evolutivo as plantas tiveram que desenvolver mecanismos de defesa contra os inúmeros tipos de predadores. Essas formas de proteção adquiridas pelos vegetais foram tanto físicas, como por exemplo, a presença de espinhos, pêlos e folhas rígidas que evitam a sua ingestão por animais superiores, quanto químicas, como a formação de uma camada epicuticular constituída por ceras para impedir a perda excessiva de água e ajudar a bloquear a entrada de agentes patogênicos e o desenvolvimento de rotas biossintéticas para produção de substâncias tóxicas ou nocivas a parasitas e predadores <sup>(2,3)</sup>.

Por um longo tempo esses compostos tóxicos oriundos de processos alternativos foram considerados apenas simples resíduos do metabolismo e a sua importância para os vegetais era completamente desconhecida. Hoje, está definido que as principais funções dessas substâncias orgânicas micromoleculares, denominadas de produtos do metabolismo secundário, são: a) atuar como agentes de defesa para repelir e até mesmo matar possíveis organismos patogênicos, insetos fitófagos e herbívoros predadores; b) ou atuar como agentes de competição, agindo como modificadores do comportamento germinativo e do crescimento de espécies vegetais estranhas quando de sua liberação por exsudação radicular, lixiviação ou volatilização, acabando por garantir, muitas vezes, a ocupação territorial por uma população. Além de atividades inibitórias, destaque também deve ser dado a capacidade estimulatória, visto que podem servir como atraentes de animais polinizadores e dispersores de sementes promovendo assim a perpetuação de uma espécie.

Em suma, os produtos do metabolismo secundário são substâncias evolutivamente selecionadas para conferir vantagens adaptativas às espécies produtoras. A efetiva participação nas interações bioquímicas de convivência e comunicação entre as plantas e os outros vários organismos vivos no sistema ambiental evidencia claramente o papel fundamental desempenhado por eles em processos ecológicos naturais e agrícolas.

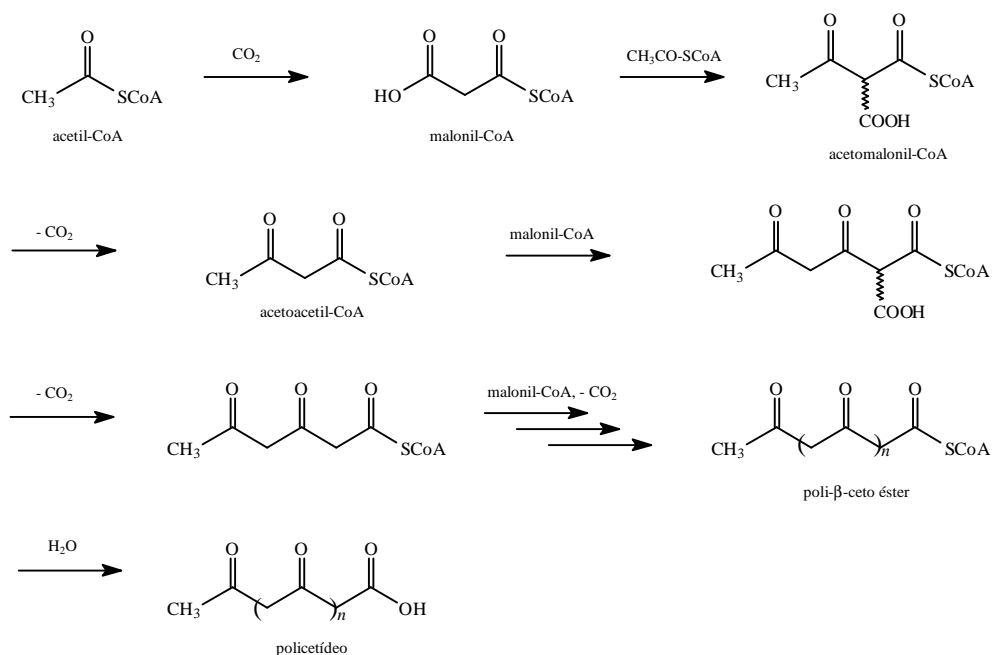
### 1.2.2. Biogênese<sup>(1,5,6)</sup>

A partir da análise cuidadosa das estruturas de um grande número de produtos naturais e de estudos com marcação isotópica foram elaboradas várias hipóteses acerca de como se processa o metabolismo secundário em plantas. Basicamente, existem três rotas biogênicas que conduzem a formação de produtos secundários: a via do acetato-malonato, a via do ácido mevalônico e a via do ácido shiquímico.

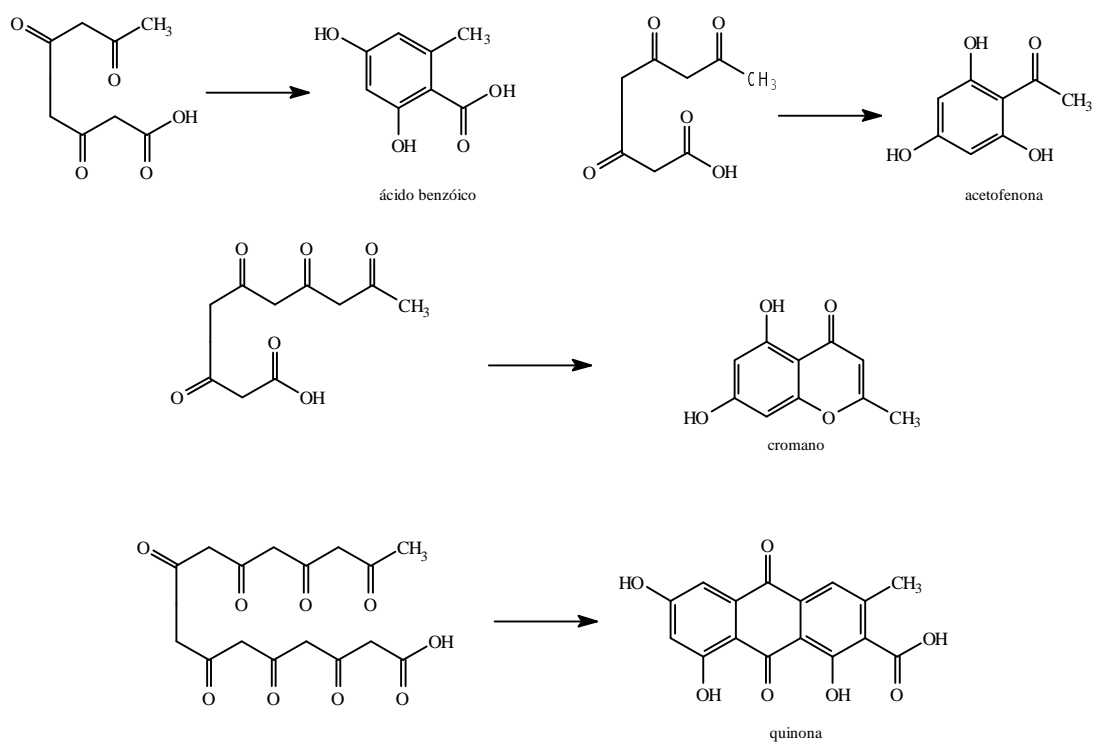
#### 1.2.2.1. A via do acetato-malonato

A via do acetato-malonato é uma das seqüências reacionais que conduz à produção de substâncias com estruturas moleculares contendo anéis aromáticos. Em sua primeira etapa a acetil-CoA aceita anidrido carbônico para formar a malonil-CoA. Esta reage com outra molécula de acetil-CoA resultando em acetilmalonil-CoA, a qual sofre descarboxilação para produzir acetoacetil-CoA. Então, a formação dos policetídeos procede à medida que ocorrem sucessivas condensações entre a acetoacetil-CoA e a malonil-CoA seguidas da perda de dióxido de carbono e da hidrólise dos diferentes poli- $\beta$ -ceto ésteres (Fig. 4).

Como consequência da reatividade dos grupos metilenos, os policetídeos, por sua vez, podem experimentar condensação intramolecular, o que irá proporcionar a biossíntese de compostos fenólicos conhecidos como acetogeninas e com estruturas moleculares diretamente dependentes do número de unidades de acetato conectadas. Alguns exemplos típicos são: os ácidos benzóicos ( $C_6-C_1$ ), as acetofenonas ( $C_6-C_2$ ), os cromanos ( $C_6-C_3$ ) e as quinonas (Fig. 5).



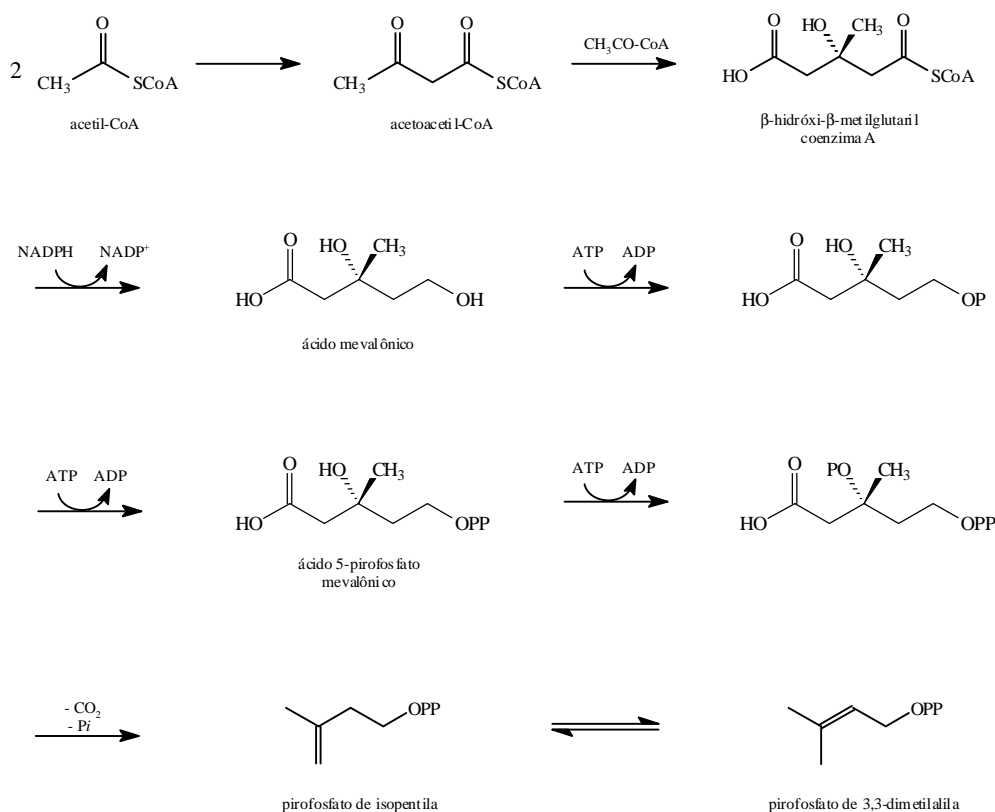
**Figura 4.** Expressão da gênese dos policetídeos.



**Figura 5.** Expressão da gênese das acetogeninas.

### 1.2.2.2. A via do ácido mevalônico

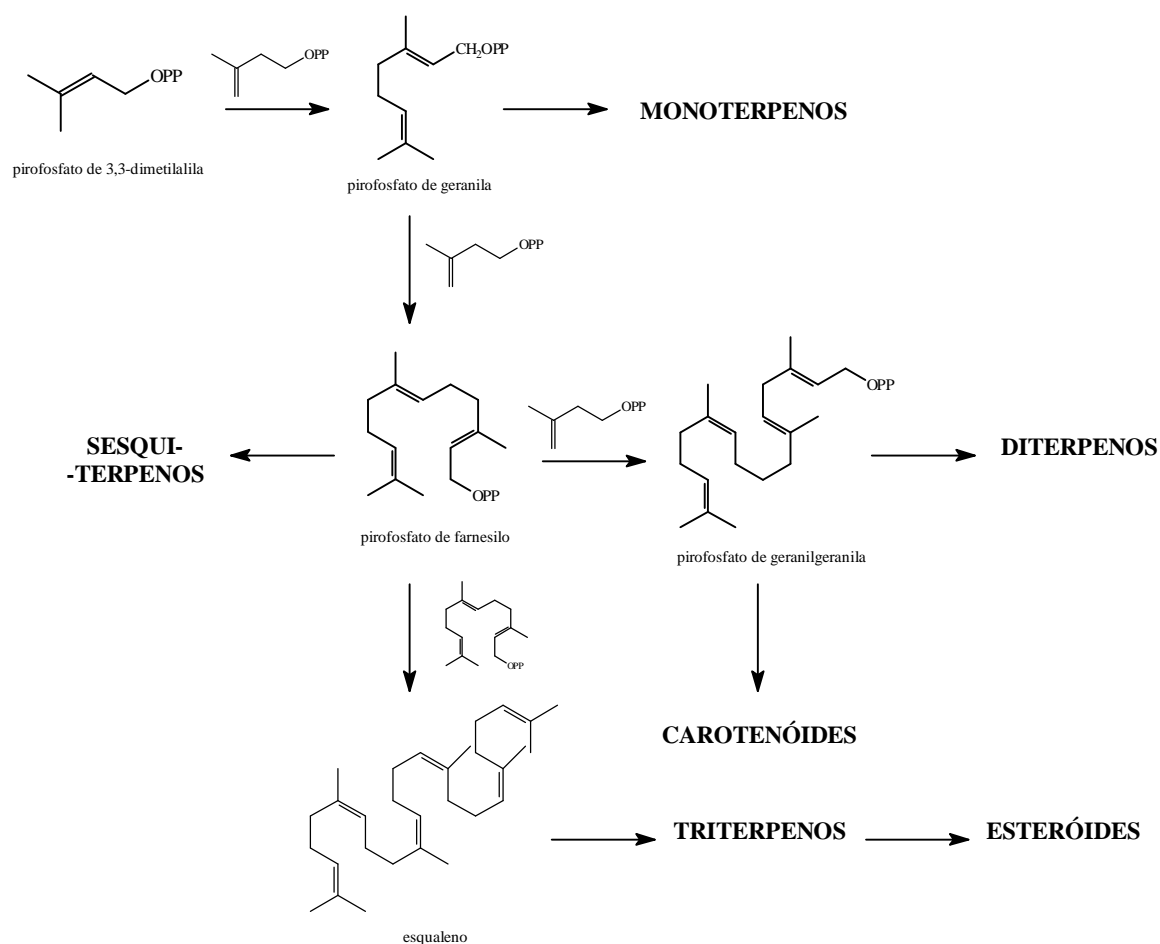
A via do ácido mevalônico é o caminho reacional para biossíntese de todos os tipos de compostos terpenóides. O ácido mevalônico, um produto da condensação de três moléculas de ácido acético, é obtido a partir da redução da  $\beta$ -hidróxi- $\beta$ -metilglutaril coenzima-A, um intermediário formado exclusivamente pela condensação aldólica da acetoacetil-CoA com a acetil-CoA. As sucessivas etapas de fosforilação do ácido mevalônico levam a formação do ácido 5-pirofosfato-mevalônico, que aparece como progenitor daquele que é considerado o “*building block*” dos compostos terpênicos, o pirofosfato de isopentila. A isomerização enzimática deste hemiterpeno resultará no reativo pirofosfato de 3,3-dimetilalila (Fig. 6).



**Figura 6.** Expressão da gênese do pirofosfato de isopentila e do pirofosfato de 3,3-dimetilalila.



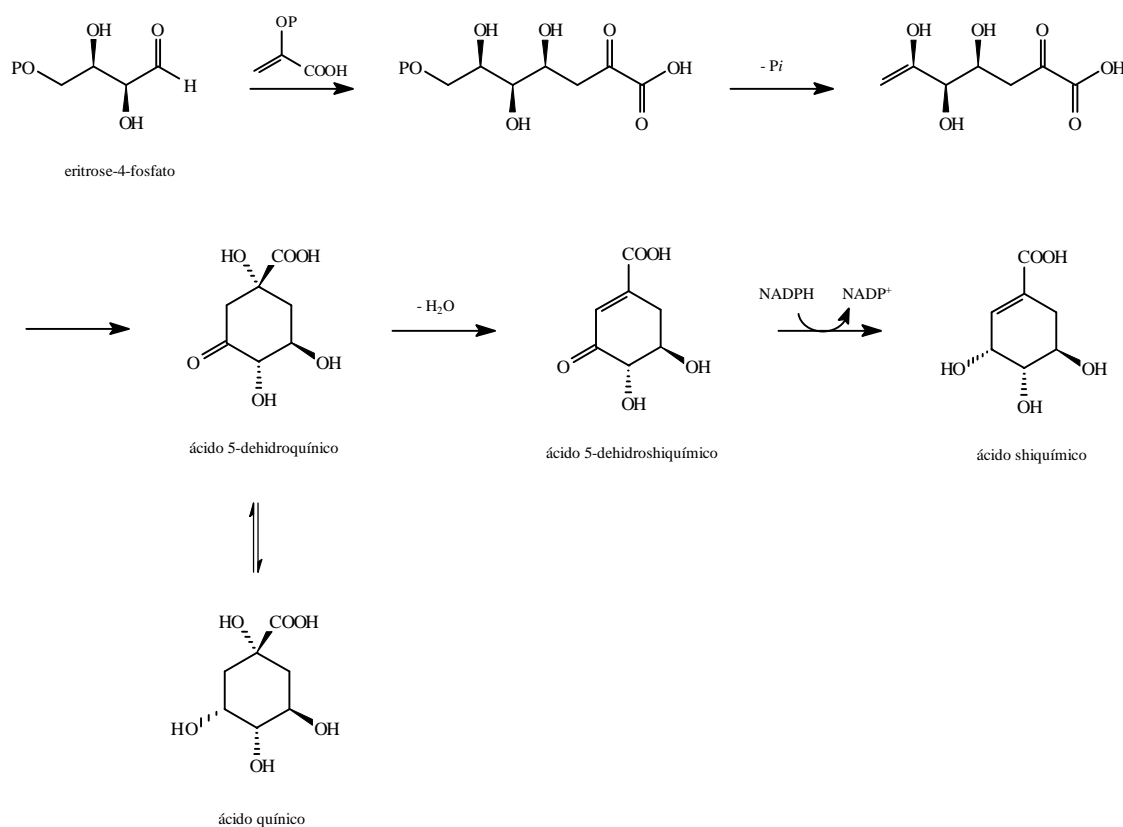
Das reações entre o pirofosfato de isopentila com pirofosfato de 3,3-dimetilalila e com os substratos intermediários gerados são formados os esqueletos carbônicos básicos que vão originar os diversos tipos de estruturas terpenóides, após sofrerem ciclização e/ou oxidação (Fig. 7). Definitivamente, o sucesso da biossíntese dos terpenos através de sucessivas reações de substituição nucleofílica alifática, onde acontece a formação de ligações carbono-carbono para união de unidades isoprênicas, deve-se à significativa nucleofilicidade da dupla terminal do pirofosfato de isopentila, à excepcional habilidade de alquilação dos ésteres de fosfato concedida pelo sistema alílico e pela presença de um excelente grupo de saída para reações de substituição.



**Figura 7.** Biossíntese dos compostos terpenóides.

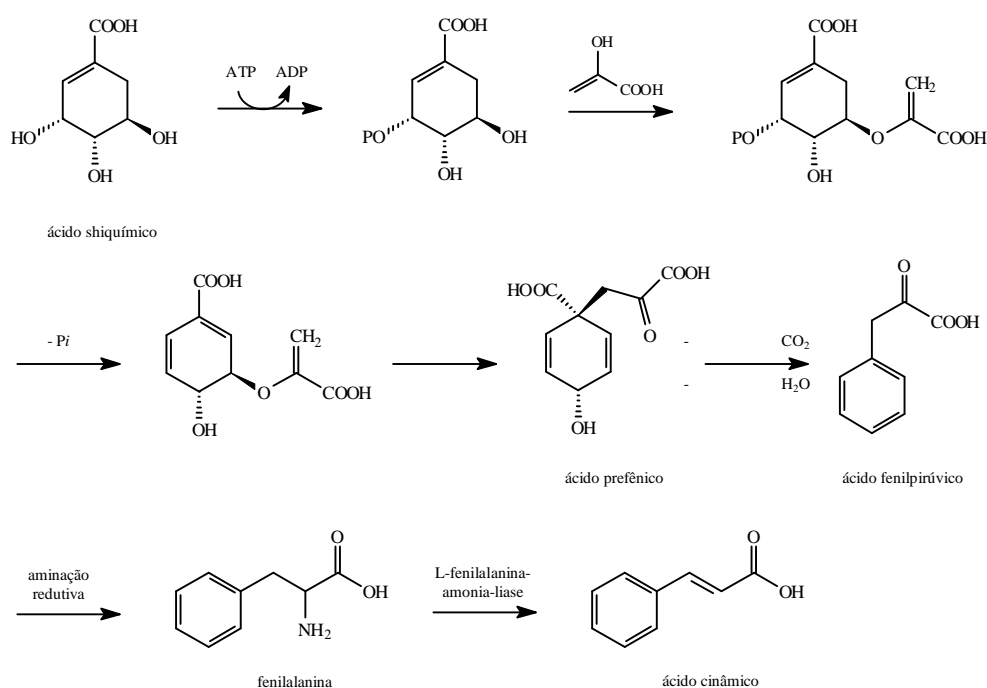
### 1.2.2.3. A via do ácido shiquímico

O ácido shiquímico é reconhecido como uma espécie química essencial para o metabolismo secundário dos vegetais, pois a partir dele são sintetizados a grande maioria dos constituintes com núcleos benzênicos, possuidores de unidades dos tipos C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-(C<sub>2</sub>)<sub>x</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. A sua formação ocorre através de cinco etapas e é iniciada pela reação entre a eritrose-4-fosfato e o ácido fosfoenolpirúvico, conforme ilustra a Figura 8.



**Figura 8.** Expressão da gênese do ácido shiquímico.

Em primeira instância, a rota do shiquimato leva à produção de ácido fenilpirúvico, apresentando como etapa-chave a descarboxilação e desidratação concertadas do ácido prefênico para formação do grupo substituinte fenila. Através da aminação redutiva do ácido fenilpirúvico obtém-se a fenilalanina, um importante amino-ácido aromático constituinte de várias proteínas que com auxílio do componente catalítico adequado sofre eliminação de amônia para resultar em ácido cinâmico (Fig. 9).



**Figura 9.** Expressão da gênese do ácido fenilpirúvico, da fenilalanina e do ácido cinâmico.

O próprio ácido cinâmico ao sofrer segundas derivatizações vai dar origem a uma série de outros ácidos 3-fenil-propanóicos (p.e. os ácidos *o*-hidroxicinâmico, cumárico, cafeico, felúrico, sinápico, etc.). Os integrantes dessa família de compostos são considerados intermediários-chave na rota do shiquimato e merecem destaque por

ocuparem esta posição estratégica dentro do metabolismo secundário de plantas. Essas espécies mediadoras podem, então, sofrer:

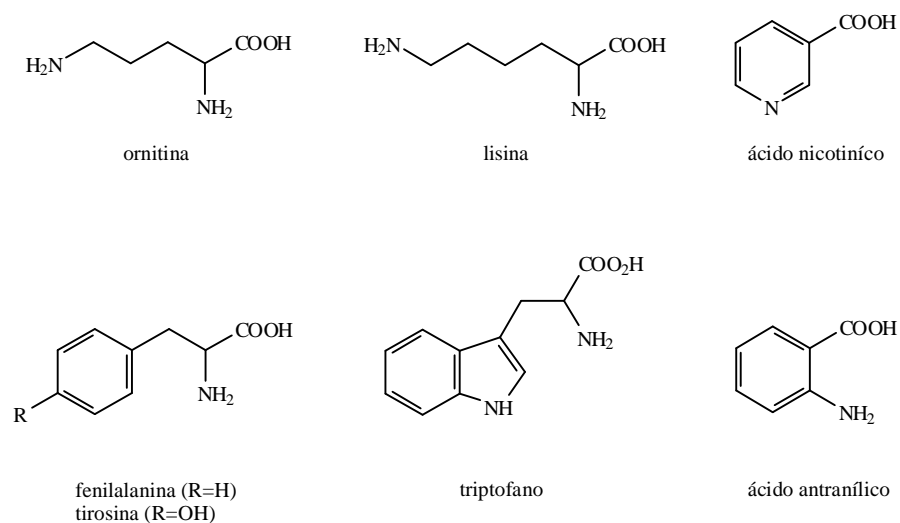
- a) ciclização intramolecular, favorecida pela presença de uma hidroxila localizada em posição *orto* a cadeia carbônica aberta, para gerar os cumarinóides;
- b) oxidação para produção dos  $\beta$ -ceto-derivados, os quais vão dar origem a compostos das classes  $C_6-C_1$  (derivados do ácido benzóico),  $C_6-C_2$  (derivados da acetofena) e  $C_6-C_1-C_6$  (xantonóides);
- c) redução aos respectivos fenilpropanóides (compostos do tipo  $C_6-C_3$  que se apresentam na forma de aldeídos, álcoois e alcenos); os produtos da dimerização oxidativa dos fenilpropanóides são os lignóides;
- d) reagir com diferentes equivalentes de malonil-CoA para gerar poli- $\beta$ -ceto ésteres, que de modo similar aos policetídeos são suscetíveis a ciclização, resultando em compostos das classes  $C_6-C_3-(C_2)_x$  ( $\alpha$ -pironas e estilbenóides) e  $C_6-C_3-C_6$  (flavonóides). A Figura 10 ilustra todas essas transformações.

#### 1.2.2.5. Metabólitos secundários contendo o Nitrogênio ou Enxofre

As plantas são capazes de produzir compostos contendo em suas estruturas moleculares os elementos nitrogênio e enxofre.

Um dos tipos de metabólitos mais comentados são os alcalóides, isto devido as suas marcadas atividades fisiológicas. Essas substâncias naturais constituem um enorme e heterogêneo grupo de bases nitrogenadas que derivam de aminoácidos como a ornitina, lisina, ácido nicotínico, fenilalanina, tirosina, triptofano e ácido antranílico (Fig. 11).





**Figura 11.** Aminoácidos que participam da biossíntese dos alcalóides.

As aminas, compostos nitrogenados que também podem ocorrer em vegetais, por sua vez, não podem ser classificadas como alcalóides, pois não apresentam em suas estruturas unidades cíclicas e porquê são mais solúveis em água do que em solventes orgânicos. Elas são formadas pela descarboxilação de aminoácidos ou pela transaminação de aldeídos. Nitrilas e nitro-compostos já foram encontrados em espécies vegetais; provavelmente, eles são produtos da hidrólise de glicosídeos cianogênicos e da oxidação de aminas, respectivamente.

Os compostos contendo o elemento enxofre, tais como tióis ( $\text{RSH}$ ), sulfetos ( $\text{RSR}'$ ), disulfetos ( $\text{RSSR}'$ ), polisulfetos ( $\text{RS}_x\text{R}'$ ), sulfóxidos ( $\text{RS(O)R}'$ ) e compostos catiônicos ( $(\text{CH}_3)_2\text{S}^+\text{R}$ ), são espécies químicas voláteis, de rara ocorrência em vegetais e que caracterizam-se pelo odor ofensivo. Acredita-se que biogeneticamente eles sejam produzidos a partir de aminoácidos.

### 1.2.3. Importância

A grande diversidade e a fantástica complexidade das estruturas moleculares apresentadas pelos metabólitos secundários, considerados por alguns como metabólitos especiais, são capazes de apontá-los como modelos de potencialidade e versatilidade indescritíveis. Por este motivo, percebeu-se, indubitavelmente, que a exploração racional desses compostos micromoleculares biossintetizados pelas plantas poderia providenciar significativos avanços científicos. Para atender esta eminente necessidade aparece a Fitoquímica, o mais importante segmento da Química de Produtos Naturais que tem como objetivo supremo conjugar o conhecimento adquirido sobre essas substâncias com a importância e a potencial aplicabilidade em outros campos científicos correlatos.

Há muito tempo o homem faz uso dos vegetais para diferentes fins e, portanto, o estudo científico das plantas tornou-se necessário e imprescindível. O motivo fundamental capaz de sustentar e impulsionar as pesquisas sobre o conteúdo químico dos referidos organismos é a sua utilização milenar e empírica no tratamento dos mais diferentes tipos de doenças e moléstias que acometem o ser humano. Em sua grande maioria, os estudos químicos que envolvem vegetais, iniciados já no século XIX, têm como objetivo primário o isolamento e a elucidação das estruturas moleculares de possíveis substâncias farmacologicamente ou biologicamente ativas presentes em extratos de plantas amplamente empregadas na medicina popular, visando desta forma, a descoberta de drogas ou protótipos que possam dar suporte para o planejamento de novos fármacos ou a formulação de composições medicamentosas naturais<sup>(7-11)</sup>. Trabalhos desse tipo, onde prevalece o caráter multidisciplinar, vêm demonstrando que dentre todos os constituintes químicos são os metabólitos secundários os principais responsáveis pelas propriedades terapêuticas apresentadas pelas chamadas plantas medicinais.

Os óleos de essências de plantas são misturas constituídas por um número variado de substâncias orgânicas onde os principais componentes são provenientes das rotas secundárias, no caso monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Estas composições naturais são dotadas de propriedades biológicas, farmacológicas e organolépticas. Devido a essas características os óleos vegetais tornaram-se um conveniente atrativo para as indústrias alimentícia e de cosméticos e perfumaria, visto

que estariam aptos ao uso como aditivos, aromatizantes, corantes, pigmentos, fragrâncias ou princípios ativos em produtos economicamente importantes.

Não há dúvidas que sempre foi grande o interesse em reduzir as infestações de culturas e lavouras por plantas consideradas invasoras, pois elas representam um dos principais problemas da produção agrícola. Uma das soluções encontradas foi o emprego de defensivos agrícolas sintéticos, porém, o uso indiscriminado e excessivo de agrotóxicos foi a causa do aumento da resistência de pragas, microorganismos fitopatogênicos e ervas daninha, da propagação de problemas de contaminação do meio ambiente e da intoxicação de animais em geral. Na seção anterior foi visto que os metabólitos secundários são os responsáveis pela interação alelopática entre as espécies vegetais, isto porque, através de algum mecanismo podem contemporizar o crescimento de outras plantas. Fundamentada nestes fatos e respeitando os ideais da agricultura sustentável, a qual defende o uso racional de recursos naturais, a Fitoquímica também é norteadada pela prospecção de aleloquímicos capazes de retardar significativamente o desenvolvimento de plantas invasoras e com potencial suficiente para serem utilizados em substituição aos defensivos agrícolas convencionais<sup>(12-16)</sup>. Ressalta-se ainda que muitas das informações obtidas com estudos deste tipo são necessários para o entendimento dos mecanismos de adaptação e evolução das plantas em seus respectivos habitats e, conseqüentemente, da relação desses indivíduos dentro do ecossistema.

Com o passar dos anos, as pesquisas no âmbito da Fitoquímica, realizadas com o insistente propósito de descobrir princípios ativos, proporcionaram o acúmulo de informações a respeito da composição química de um grande número de plantas. A análise dos dados levantados indicou que os produtos do metabolismo secundário apresentavam distribuição restrita a conjuntos específicos de organismos, ou seja, eram característicos de grupos taxonômicos, tais como Família e Gênero. Logo, estava revelado que esses caracteres químicos poderiam ser utilizados diretamente como marcadores para determinação da posição hierárquica evolutiva dos seres do Reino Vegetal e quando compatibilizados com dados morfológicos permitiriam o estabelecimento de sistemas modernos de classificação vegetal<sup>(17-19)</sup>. Com essas finalidades, surge a Quimiotaxonomia (também chamada de Sistemática Química) como contribuinte aos estudos botânicos.

Os metabólitos secundários estão situados, também, como interessantes modelos para reações químicas. Aqui estão incluídas as suas utilidades como:



- a) substratos para o desenvolvimento de novas metodologias de síntese orgânica;
- b) substratos para procedimentos de biotransformações (microbiológicas e enzimáticas) que buscam atingir bons níveis de régio- e enantiosseletividades;
- c) substratos para estudos físico-químicos que visam a descrição do comportamento e desempenho de catalisadores metálicos e organometálicos;
- d) substratos para estudos eletroquímicos que têm como objetivos a análise do comportamento eletroquímico e a possível apresentação de mecanismos para o processo desenvolvido;
- e) substratos para realização de transformações biomiméticas que possam subsidiar a elaboração das rotas biogenéticas; e
- f) como materiais de partida para síntese de produtos úteis, alguns até de grande consumo e com alto valor econômico, e de inviável obtenção por métodos sintéticos laboratoriais e processos industriais conhecidos.

Neste contexto fica nitidamente evidenciado que os resultados advindos das investigações de substâncias naturais produzidas a partir do metabolismo secundário de organismos vegetais assumem importância e interesse interdisciplinar em função das inúmeras contribuições, principalmente, para os ramos da Medicina, Farmacologia, Agronomia, Botânica, Ecologia e da própria Química<sup>(20)</sup>.

Ainda que um substancial número de produtos naturais já tenha sido encontrado em organismos vivos, muito de relevante permanece por ser explorado. Quanto às perspectivas, a Fitoquímica, mais do que nunca, se mostra otimista devido aos constantes avanços e aperfeiçoamentos das técnicas analíticas e dos métodos espectroscópicos, ao estabelecimento de novas interfaces com outras áreas que auxiliam na superação dos inúmeros desafios e, sobretudo, pela gigantesca biodiversidade da flora terrestre que engloba, de acordo com as estimativas dos taxonomistas, cerca de 500.000 espécies de plantas superiores e certamente constitui um dos mais valiosos e promitentes acervos de novas e potenciais substâncias. Assim, o planejamento de programas nesta área do saber vem sendo uma crescente, tanto no meio acadêmico quanto nos setores indústrias, e os novos rumos e tendências tomados por ela serão frutos exclusivos das necessidades do homem. Finalmente, é necessário lembrar que muitos dos espécimes dos repositórios naturais poderão se extinguir em razão da destruição descontrolada de ecossistemas e se providências imediatas não surgirem, a

humanidade deixará de usufruir de possíveis benefícios indispensáveis ao seu desenvolvimento e até mesmo sua sobrevivência.

### **1.3. Considerações gerais sobre a espécie vegetal *Polygala sabulosa* (Polygalaceae)**

Segundo Zomlefer, a família Polygalaceae é constituída por aproximadamente 800 espécies que estão reunidas em 15 gêneros e podem ser encontradas por todo o planeta com exceção da Nova Zelândia e do Ártico. Os gêneros *Polygala* e *Monnina* são os maiores representantes, incluindo cerca de 600 e 150 espécies, respectivamente<sup>(21)</sup>.

As espécies do gênero *Polygala* são ervas, subarbustos e raras vezes árvores com folhas normalmente alternas e ocasionalmente opostas ou verticiladas, flores brancas, esverdeadas, cor de rosa ou roxas, hermafroditas e zigomorfas, frutos capsulares, drupáceos ou samaróides e sementes com corpo glabro, pubérulo e globoso. Wurdack e Smith<sup>(22)</sup> relataram a ocorrência de 19 dessas espécies, incluindo *Polygala sabulosa*, em território catarinense e as descreveram de acordo com suas características morfológicas e ecológicas.

*Polygala sabulosa* A. W. Bennett, conhecida vulgarmente como “timuto-pinheirinho”, é uma erva glabra, algo lenhosa na base, com ramos compridos, folhas alternas, numerosas e laminares, flores brancas até de cor de rosa e roxas que estão presentes no período de outubro a março, frutos capsulares e sementes elipsóides (Fig. 12). Ela é higrófita e heliófita, característica e exclusiva da “Zona dos campos” do planalto meridional, onde apresenta vasta e expressiva dispersão preferencialmente nos campos úmidos e nas beiras de regatos junto à vegetação graminácea alta ou a vegetação arbustiva<sup>(22)</sup>.

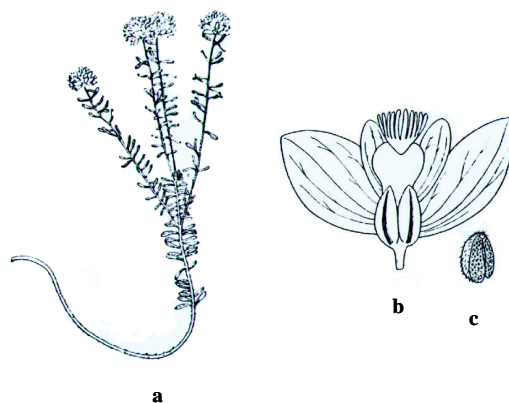
Como muitas das espécies de seu gênero, *P. sabulosa* também tem sua aplicação na medicina tradicional; o característico odor de salicilato de metila em suas raízes induz o uso desta planta como anestésico local e expectorante. A seguir apresenta-se a sua posição sistemática.

---

**Posição sistemática da espécie *Polygala sabulosa* (Polygalaceae)**

Divisão:	Angiospermae
Classe:	Dicotyledoneae
Sub-classe:	Rosidae
Super-ordem:	Geraniae
Ordem:	Polygalales
Família:	Polygalaceae
Tribo:	Polygalae
Gênero:	<i>Polygala</i>
Espécie:	<i>Polygala sabulosa</i> A. W. Bennet
Sinonímia vulgar:	“Timuto-pinheirinho”

---



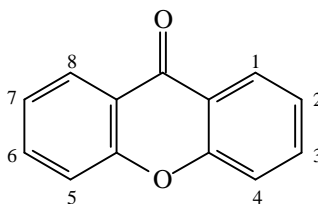
**Figura 12.** *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (a. ramo basal, b. flor, c. semente)<sup>(22)</sup>.

#### 1.4. Constituintes químicos do gênero *Polygala* (Polygalaceae)

As investigações fitoquímicas realizadas nas últimas três décadas revelaram a ocorrência de um vasto espectro de metabólitos em espécies de *Polygala*, que inclui: saponinas (78-88)<sup>(23,24)</sup>, esteróides (89-91)<sup>(25-27)</sup>, flavonóides livres e glicosilados (92-100)<sup>(26-29)</sup>, cumarinas (101-105)<sup>(30,31)</sup>, ésteres de ácidos cinâmicos com oligossacarídeos (106-131)<sup>(32-37)</sup> e polissacarídeos (133-156)<sup>(34-36)</sup>, dihidroestiril-2-pironas e estilil-2-pironas (157-162)<sup>(31)</sup>. Contudo, as xantonas são os compostos mais freqüentemente encontrados e por isso podem ser consideradas os verdadeiros marcadores quimiotaxonômicos do gênero.

As poligalaxantonas, como são chamadas, caracterizam-se pela variação do padrão e da quantidade de *O*-substituição dos sistemas aromáticos, onde os grupos fenólicos aparecem livres, na forma de éteres metílicos, como grupos metilenodioxi ou ainda como acetais de glicosídeos. Alguns casos de *C*-substituição dos anéis benzênicos também já foram reportados. Na Tabela 1 são listadas um total de 77 xantonas relatadas na literatura para o gênero *Polygala*.

**Tabela 1.** Xantonas isoladas de espécies do gênero *Polygala* (Polygalaceae).



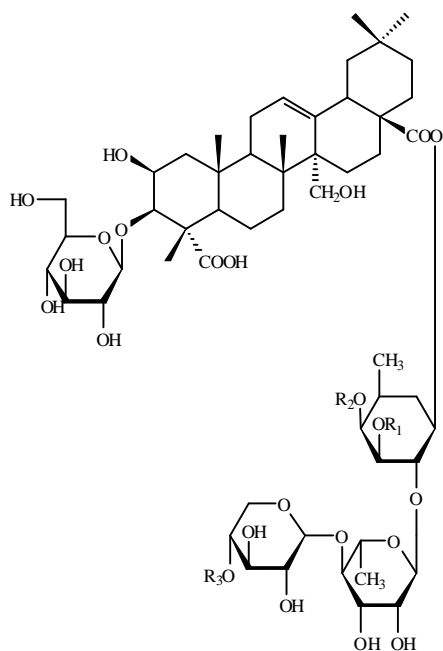
Núcleo xantonóide

Espécie	Composto	Lit.
<i>P. arillata</i>	1-hidroxi-2,3-dimetoxixantona (1)	38
	1,2,3-trimetoxixantona (2)	
	1-hidroxi-2,3-metilenodioxi-xantona (3)	
	1-metoxi-2,3-metilenodioxi-xantona (4)	
	1,3,4-trimetoxixantona (5)	
	1,2,3,4,7-pentametoxixantona (6)	
<i>P. caudata</i>	1,7-dihidroxixantona (euxantona) (7)	26

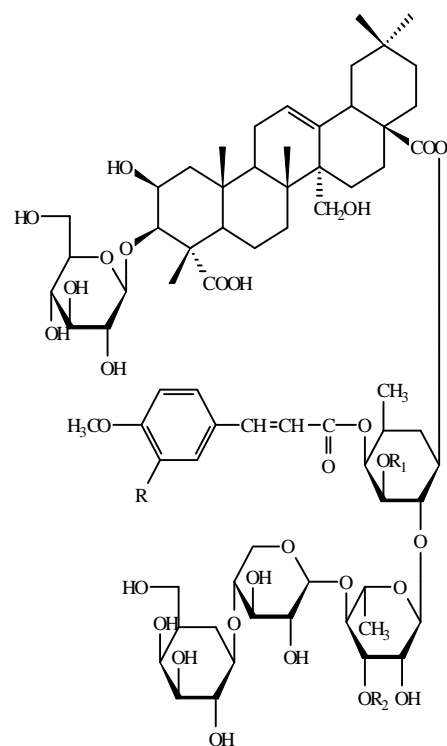
<i>P. caudata</i>	7-hidroxi-1-metoxixantona ( <b>8</b> ) 1,2,8-trihidroxi-1-metoxixantona ( <b>9</b> ) 1,3,7-trihidroxi-1-metoxixantona (gentiseísa) ( <b>10</b> ) 1,3-dihidroxi-2-metoxixantona ( <b>11</b> ) 1-hidroxi-7- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1-2)- $\beta$ -D-glicopiranosil]xantona (polycaudosida A) ( <b>12</b> ) 1,3,6,7-tetrahidroxi-2- <i>C</i> -[ $\beta$ -D-(2'-benzoil)-glicopiranosil]xantona (2'-benzoilmangiferína) ( <b>13</b> ) 1-hidroxi-7- <i>O</i> -[ $\beta$ -D-apiofuranosil-(1-2)- $\beta$ -D-glicopiranosil]xantona (wubangzisida A) ( <b>14</b> ) 1-hidroxi-7- <i>O</i> -[ $\beta$ -D-glicopiranosil]xantona (wubangzisida B) ( <b>15</b> ) 1,3,7-trihidroxi-2,4- <i>C</i> -di-[ $\beta$ -D-glicopiranosil]xantona (wubangzisida C) ( <b>16</b> ) 1,3,7-trihidroxi-4- <i>C</i> -[ $\beta$ -D-glicopiranosil]xantona (lancerina) ( <b>17</b> ) 1,3,7-trihidroxi-2- <i>C</i> -[ $\beta$ -D-glicopiranosil]xantona (neolancerina) ( <b>18</b> ) 1,3,6,7-tetrahidroxi-2- <i>C</i> -[ $\beta$ -D-glicopiranosil]xantona (mangiferina) ( <b>19</b> )	26
<i>P. cyparissias</i>	1,3-hidroxi-7-metoxixantona ( <b>20</b> ) 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona ( <b>21</b> ) 1,3,7-trihidroxi-2-metoxixantona ( <b>22</b> ) 1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona ( <b>23</b> ) 1,3,6,8-tetrahidroxi-2,7-dimetoxixantona ( <b>24</b> ) 1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona ( <b>25</b> )	39
<i>P. macradenia</i>	1,2,3-trimetoxixantona ( <b>26</b> ) 1,2,4-trimetoxixantona ( <b>27</b> ) 1-hidroxi-2,3,4-trimetoxixantona ( <b>28</b> ) 1,2,3,4-tetrametoxixantona ( <b>29</b> ) 1-hidroxi-2,3,6,7-di-metilenodioxixantona ( <b>30</b> ) 1-metoxi-2,3,6,7-di-metilenodioxixantona ( <b>31</b> ) 1,6,7-trimetoxi-2,3-metilenodioxixantona ( <b>32</b> )	38

<i>P. macradenia</i>	7-hidroxi-1,2,3,4-tetrametoxixantona (33) 1-hidroxi-2,3,4,7-tetrametoxixantona (34) 1,2,3,4,7-pentametoxixantona (35)	38
<i>P. nyikensis</i>	1,7-dihidroxi-4-metoxixantona (36) 1,8-dimetoxi-2,3-metilenodioxixantona (37) 3,8-dihidroxi-1,2-dimetoxixantona (38) 1,7-dihidroxi-3,5,6-trimetoxixantona (39)	40
<i>P. paenaea</i>	1-hidroxi-2,3,4,7-tetrametoxixantona (34) 1,2,3,4,7-pentametoxixantona (35) 1-hidroxi-2,4-dimetoxi-6,7-metilenodioxixantona (40) 1,2,4-trimetoxi-6,7-metilenodioxixantona (41)	38
<i>P. paniculata</i>	1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (42) 1-hidroxi-5metoxi-2,3-metilenodioxixantona (43)	41
<i>P. spectabilis</i>	2-hidroxi-1,3-dimetoxi-6,7-metilenodioxixantona (44) 1,2,3,6,7-pentametoxixantona (45) 1,2,3-trimetoxi-6,7-metilenodioxixantona (46)	38
<i>P. tenuifolia</i>	1,7-dihidroxixantona (euxantona) (7) 1,7-dimetoxixantona (47) 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (48) 3-hidroxi-2,8-dimetoxixantona (49) 1,7-dihidroxi-3-metoxixantona (50) 2,3,8-trimetoxixantona (51) 1-hidroxi-3,6,7-trimetoxixantona (52) 7-hidroxi-1,2,3-trimetoxixantona (43) 3-hidroxi-1,2,7-trimetoxixantona (54) 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (55) 1,6-dihidroxi-3,7-dimetoxixantona (56) 1,3,6,7-tetrametoxixantona (57) 1,2,3,7-tetrametoxixantona (58) 1,7-dimetoxi-2,3-metilenodioxixantona (59) 1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona (60) 6,8-dihidroxi-1,2,3-trimetoxixantona (61) 1,6-dihidroxi-3,5,7-trimetoxixantona (62)	38 42 43 44

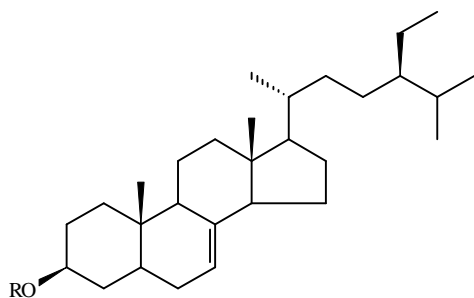
<i>P. tenuifolia</i>	6-hidroxi-1,2,3,7-tetrametoxixantona ( <b>63</b> )	38
	1,2,3,4,7-pentametoxixantona ( <b>64</b> )	42
	1,2,3,6,7-pentametoxixantona ( <b>65</b> )	43
	1,2,3-trimetoxi-6,7-metilenodioxixantona ( <b>66</b> )	44
	6- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1-2)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-1,3-dihidroxi-7-metoxixantona ( <b>67</b> )	
	6- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1-2)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona ( <b>68</b> )	
	6- <i>O</i> -[ $\beta$ -D-glucopiranosil]-1,2,3,7-tetrametoxixantona ( <b>69</b> )	
	3- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1-2)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-1,6-dihidroxi-2,7-dimetoxixantona ( <b>70</b> )	
<i>P. triphylla</i>	1-hidroxi-2,3-dimetoxixantona ( <b>1</b> )	38
	1,2,3-trimetoxixantona ( <b>2</b> )	
	1-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona ( <b>3</b> )	
	1-metoxi-2,3-metilenodioxixantona ( <b>4</b> )	
	2-hidroxi-3-metoxi-1- <i>O</i> -[ $\beta$ -D-glicopiranosil]xantona ( <b>71</b> )	
	2,3-metilenodioxi-1- <i>O</i> -[ $\beta$ -D-glicopiranosil]xantona ( <b>72</b> )	
	1-metoxi-2,3,6,7-di-metilenodioxixantona ( <b>73</b> )	
<i>P. virgata</i>	1,7-dihidroxi-3,4-dimetoxixantona (veratrilogenina) ( <b>74</b> )	28
	1,7-dihidroxi-2,3,4-trimetoxixantona ( <b>75</b> )	
<i>P. wattersii</i>	1-metoxi-7- <i>O</i> -[ $\beta$ -D-apiofuranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glicopiranosil]xantona (wattersiixantona A) ( <b>76</b> )	36
	1-metoxi-7- <i>O</i> -[ $\beta$ -D-glicopiranosil]xantona (wattersiixantona B) ( <b>77</b> )	
	wubangzisida B ( <b>15</b> )	



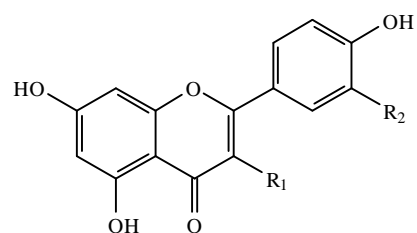
	<b>R</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>78</b>	H	b	H
<b>79</b>	ara	a	Gal
<b>80</b>	glc	b	Gal
<b>81</b>	Glc <sup>6</sup> -Ac	b	Gal
<b>82</b>	Glc <sup>6</sup> -Ac	f	Gal
<b>83</b>	H	f	Gal
<b>84</b>	H	b	Gal



	<b>R</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>85</b>	OCH <sub>3</sub>	H	H
<b>86</b>	H	Rha	H
<b>87</b>	H	Rha	Api
<b>88</b>	H	H	H

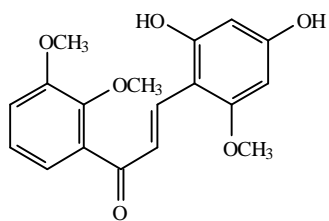


	<b>R</b>
<b>89</b>	H
<b>90</b>	H ( <sup>22</sup> )
<b>91</b>	Glc ( <sup>22</sup> )

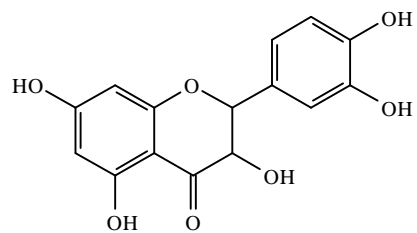


	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>92</b>	H	H
<b>93</b>	OH	OH
<b>94</b>	OH	OGlc

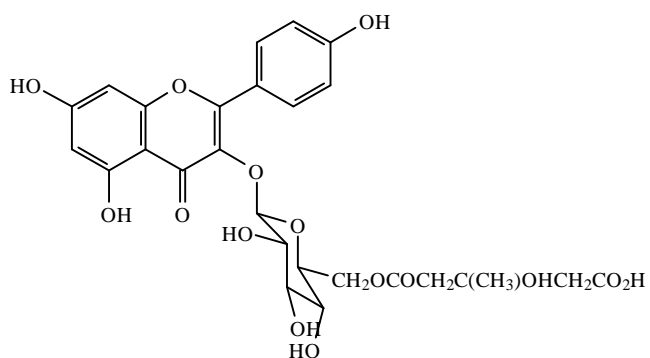
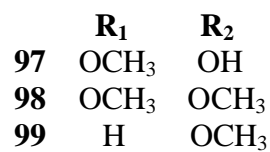
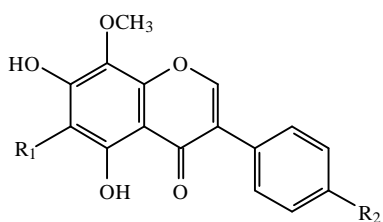




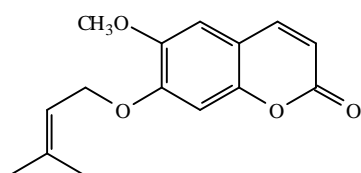
95



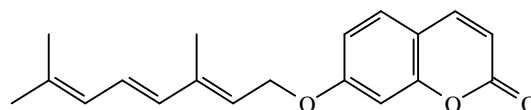
96



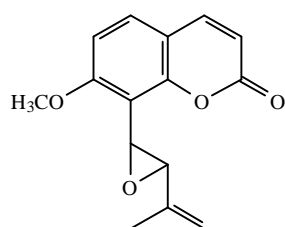
100



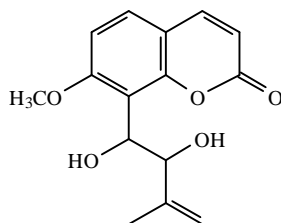
101



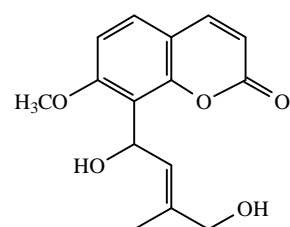
102



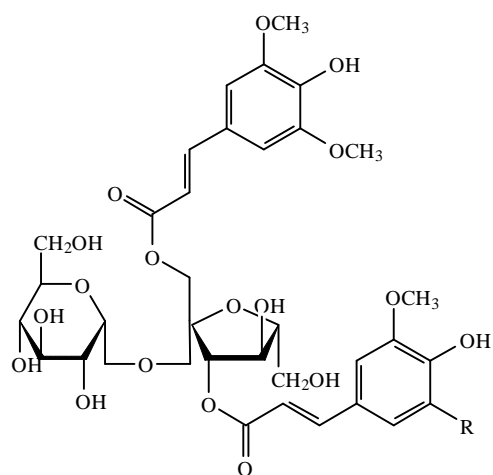
103



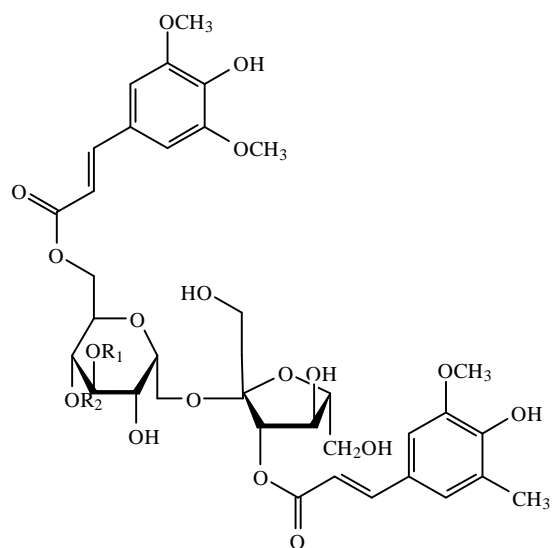
104



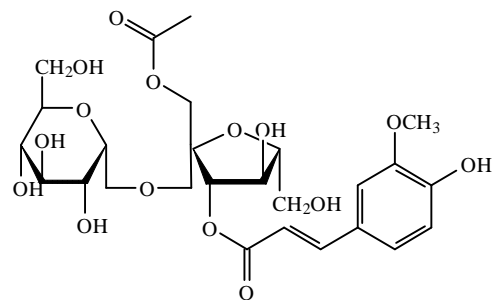
105



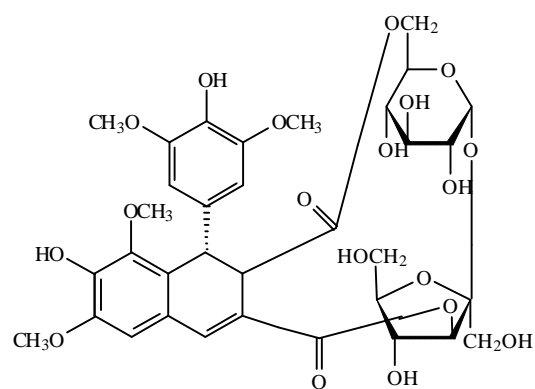
	<b>R</b>
<b>106</b>	H
<b>107</b>	OCH <sub>3</sub>



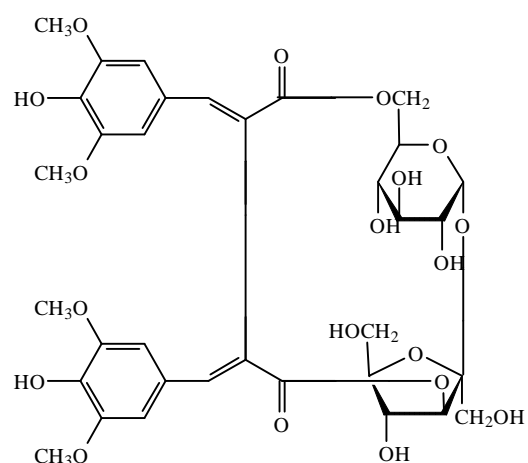
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>109</b>	H	H
<b>110</b>	Ac	H
<b>111</b>	H	Ac



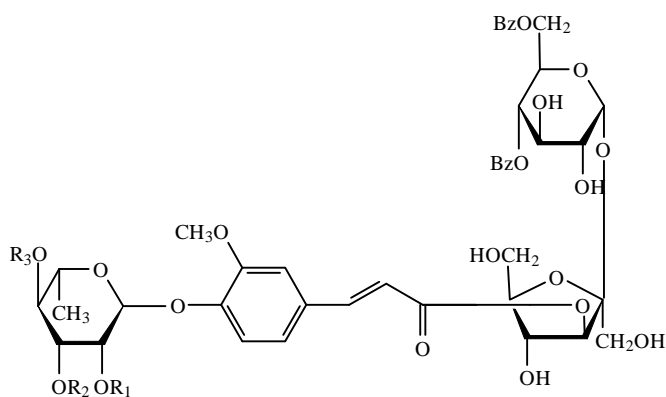
**108**



**112**

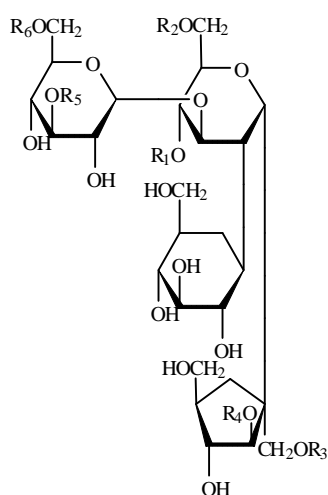


**113**

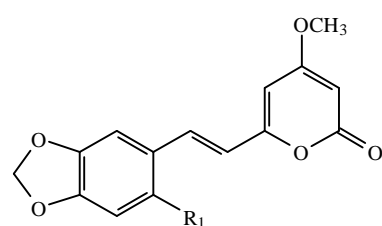
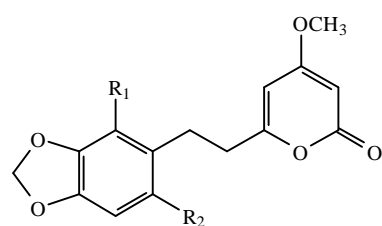


	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<b>114</b>	H	H	H
<b>115</b>	H	H	Glc
<b>116</b>	Ac	Glc	H

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<b>117</b>	H	H	i
<b>118</b>	H	Bz	i
<b>119</b>	H	c	h
<b>120</b>	H	c	i
<b>121</b>	H	h	h
<b>122</b>	H	h	i
<b>123</b>	H	i	i
<b>124</b>	H	e	i
<b>125</b>	H	e	h
<b>126</b>	H	h	e
<b>127</b>	H	h	h
<b>128</b>	H	e	H
<b>129</b>	Glc	e	H
<b>130</b>	Glc	h	H
<b>131</b>	Glc	H	e
<b>132</b>	Glc	H	h

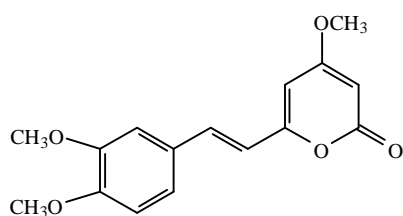


	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>
<b>133</b>	c	H	c	Bz	H	Ac
<b>134</b>	e	H	c	Bz	H	Ac
<b>135</b>	H	e	e	Bz	Glc	Ac
<b>136</b>	e	H	e	Bz	H	Ac
<b>137</b>	e	H	c	Bz	Glc	Ac
<b>138</b>	e	H	e	Bz	Glc	Ac
<b>139</b>	c	Ac	c	Bz	H	Ac
<b>140</b>	e	Ac	c	Bz	H	Ac
<b>141</b>	g	c	c	Bz	H	Ac
<b>142</b>	c	H	e	Bz	H	Ac
<b>143</b>	c	Ac	d	Bz	H	Ac
<b>144</b>	c	H	d	Bz	H	Ac
<b>145</b>	c	H	d	Bz	H	H
<b>146</b>	e	Ac	d	Bz	H	Ac
<b>147</b>	e	H	d	Bz	H	Ac
<b>148</b>	d	Ac	d	Bz	H	Ac
<b>149</b>	c	Ac	Bz	Bz	H	Ac
<b>150</b>	d	H	Bz	Bz	H	Ac
<b>151</b>	h	d	d	Bz	H	Ac
<b>152</b>	c	Ac	c	Bz	H	Ac
<b>153</b>	c	H	c	Bz	H	Ac
<b>154</b>	c	Ac	e	Bz	H	Ac
<b>155</b>	e	Ac	e	Bz	H	Ac
<b>156</b>	e	H	e	Bz	H	Ac



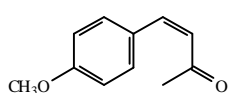
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>157</b>	H	H
<b>158</b>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>159</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

	<b>R<sub>1</sub></b>
<b>160</b>	H
<b>161</b>	OCH <sub>3</sub>

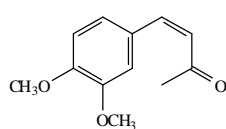


**162**

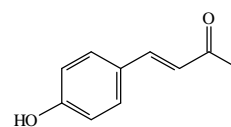
## RADICALS



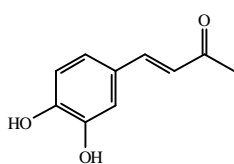
**a**



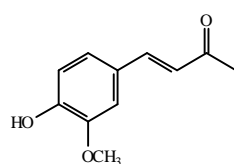
**b**



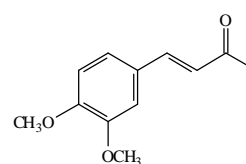
**c**



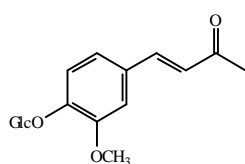
**d**



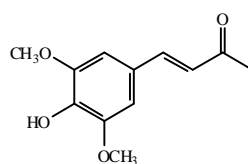
**e**



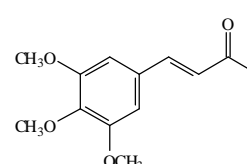
**f**



**g**



**h**



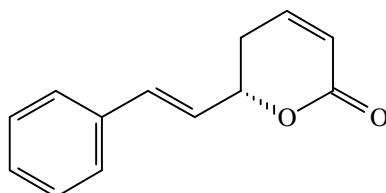
**i**

## 2. ESTIRIL-LACTONAS

### 2.1. Introdução<sup>(45)</sup>

Sistemas heterocíclicos de cinco e seis membros são unidades que ocupam lugar nas estruturas moleculares de grande parte dos metabólitos secundários de organismos do Reino Vegetal.

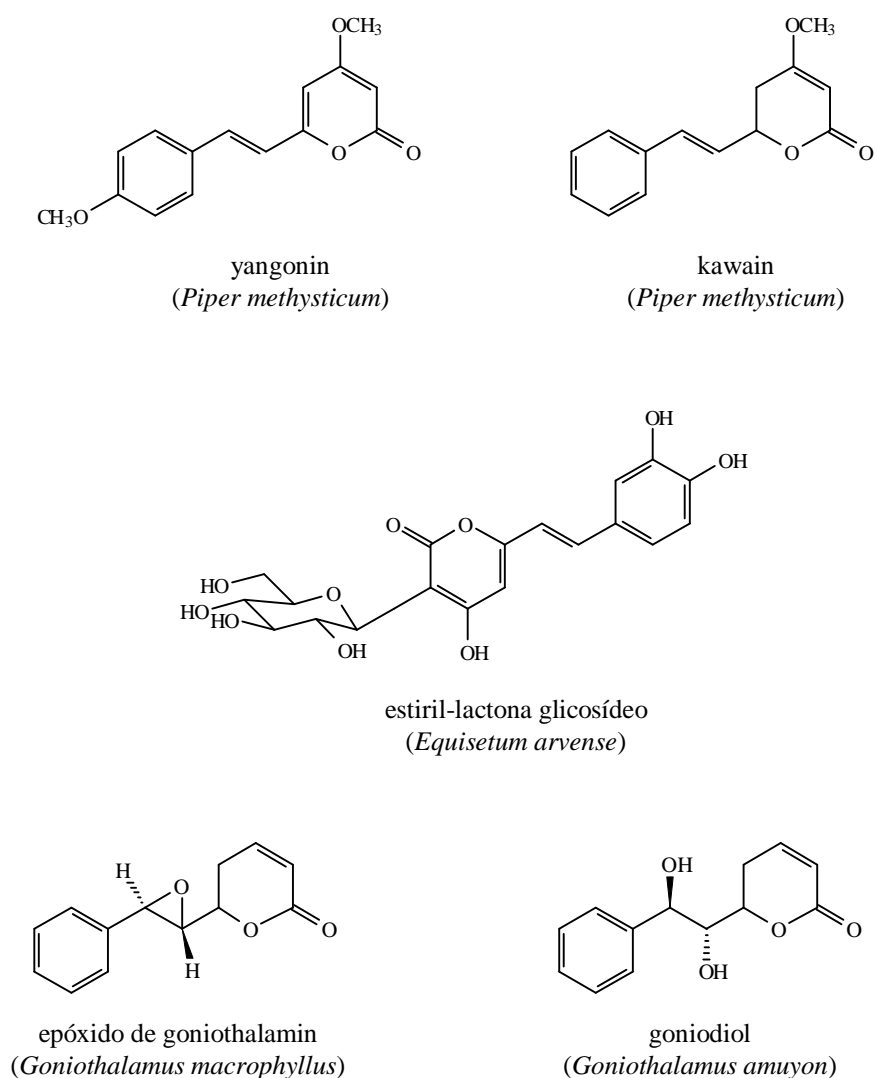
Historicamente, o isolamento efetivo da primeira estiril-lactona, obtida de quatro espécies diferentes do gênero *Goniothalamus* (Annonaceae), foi publicado em 1972 por Jewers e col., sendo ela denominada de goniotalamina (Fig. 13). Entretanto, Hlubucek e Robertson, em publicação datada do ano de 1967, haviam reportado a identificação da mesma substância na espécie vegetal *Cryptocarya caloneura* (Lauraceae); nesta ocasião, os autores descreveram-na como uma nova (+)-(5*S*)-<sub>9</sub>-lactona derivada do ácido 5-hidroxi-7-fenilhepta-2,6-dienóico.



**Figura 13.** Goniotalamina: a primeira estiril-lactona isolada de fonte natural.

Desde então, foram várias as publicações que se ocuparam em descrever o isolamento e/ou a identificação, a síntese, as propriedades biológicas (p.e. atividades anti-tumoral, citotóxica, teratogênica, embriotóxica e pesticida) e as origens biossintéticas de compostos com estes blocos estruturais presentes em fontes naturais, como plantas e fungos. Atualmente, as estiril-lactonas são consideradas como uma classe de produtos naturais bioativos e cada vez mais se tornam importantes do ponto de vista farmacológico.

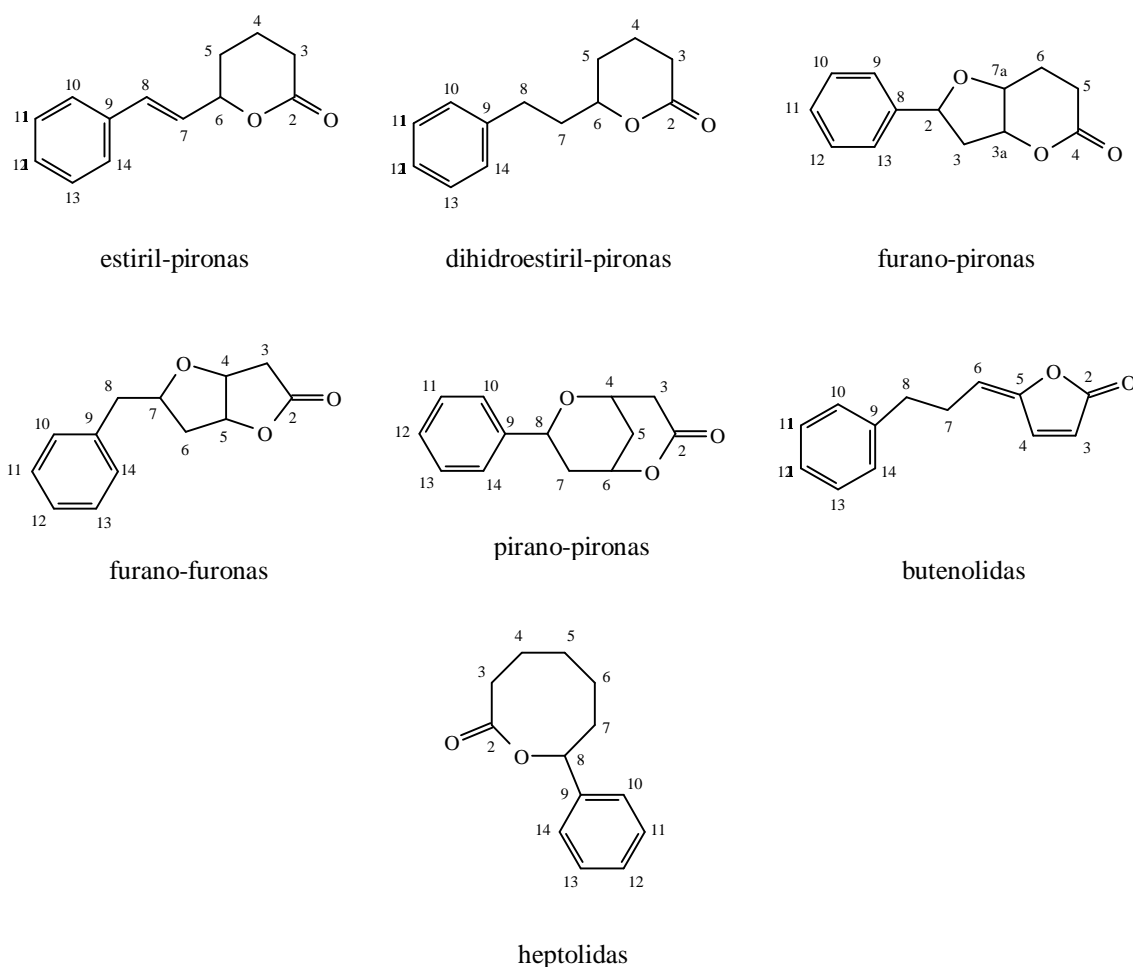
Para a quimiotaxonomia as estiril-lactonas também têm sua importância. No Reino Vegetal elas ocorrem em famílias de Angiospermas primitivas, tais como Laureaceae, Piperaceae, Ranunculaceae, Zingiberaceae e Equisetaceae. Já na família Annonaceae, que se caracteriza pela freqüente presença de alcalóides quinolínicos, as estiril-lactonas também são constantemente encontradas, principalmente no gênero *Goniothalamus*, onde estão tomando lugar como verdadeiros marcadores taxonômicos. Alguns exemplos são encontrados na figura 14<sup>(46-50)</sup>.



**Figura 14.** Exemplos representativos de estiril-lactonas isoladas de espécies vegetais.

## 2.2. Conceito e Classificação<sup>(45)</sup>

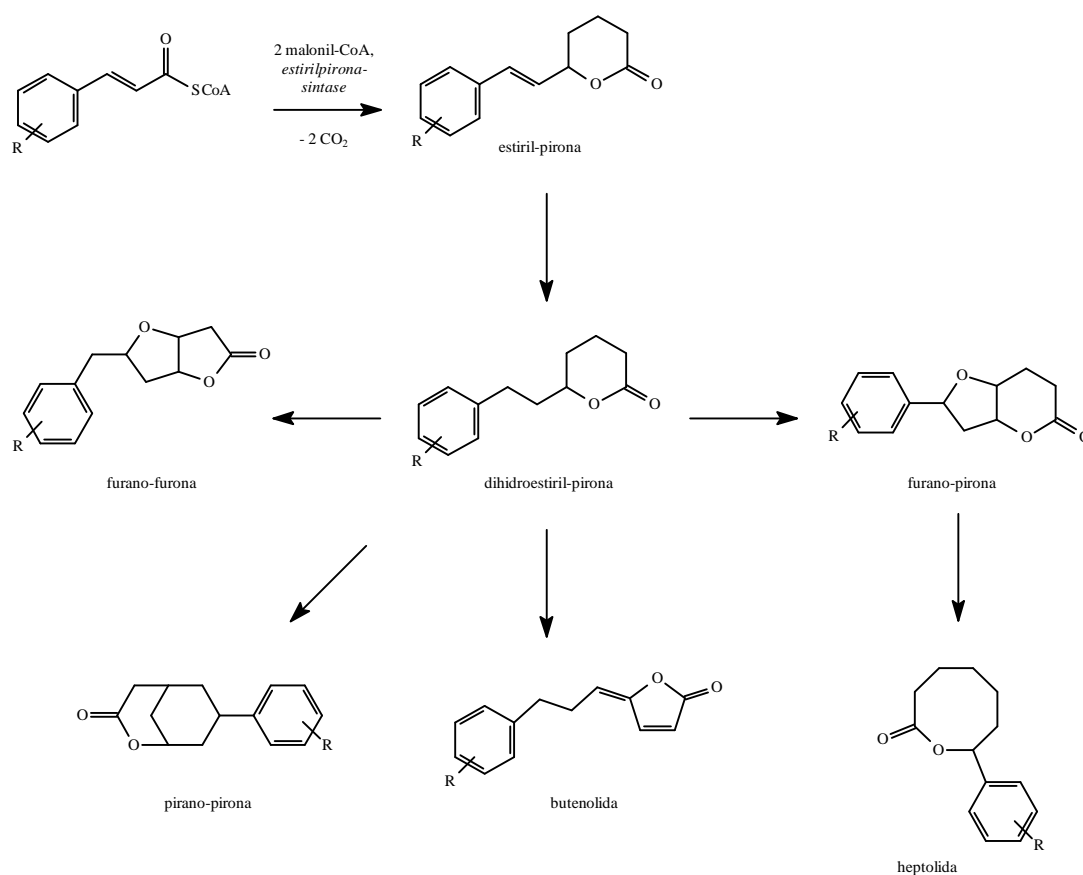
As estiril-lactonas são consideradas um grupo homogêneo e relativamente raro de produtos naturais que, de maneira formal, podem ser definidas como um conjunto de metabólitos secundários que apresentam estruturas moleculares contendo um anel  $\gamma$ -,  $\delta$ - ou  $\zeta$ -lactona conectado a um fragmento estiril ou pseudo-estiril. De acordo com seus esqueletos fundamentais elas podem ser classificadas como: estiril-pironas, dihidroestiril-pironas, furano-pironas, furano-furonas, pirano-pironas, butenolidas e heptolidas (Fig. 15).



**Figura 15.** Classificação das estiril-lactonas.

## 2.3. Biogênese

Acredita-se que tais compostos sejam bioproduzidos através da rota do ácido shiquímico. Na primeira etapa do processo, já confirmada por Herderich e col.<sup>(51)</sup> através de estudos que envolveram células livres de extratos obtidos de gametófitos da espécie vegetal *Equisetum arvense* (Equisetaceae), o apropriado ácido cinâmico, em sua forma ativa e sob ação da enzima *estirilpirona-sintase*, incorpora duas unidades de malonil-CoA e subsequente o derivado policetídeo sofre lactonização para resultar na correspondente estiril-pirona. Postula-se, então, que esta espécie química seja o material de partida para processos secundários que levem a formação das outras formas de estiril-lactonas (Fig. 16).



**Figura 16.** Hipótese sobre a biossíntese das estiril-lactonas.



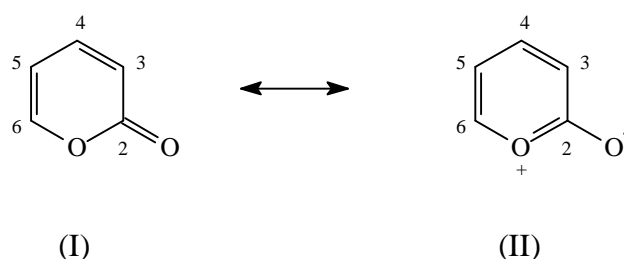
## 2.4. O heterociclo 2*H*-piran-2-ona<sup>(52)</sup>

### 2.4.1. Introdução

De todas as variações estruturais de estilil-lactonas, são destaque neste texto aquelas possuidoras do anel 2*H*-piran-2-ona. Num mesmo corpo, algo sobre este sistema heteroatômico deve ser ressaltado, visto que é ele quem confere muitas das propriedades químicas às respectivas estilil-pironas.

### 2.4.2. Estrutura, Estabilidade e Propriedades espectroscópicas

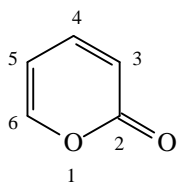
O heterociclo 2*H*-piran-2-ona é considerado, basicamente, como um anel furano expandido pela inserção de um grupo carbonila que possui duas formas ressonantes, (I) e (II) (Fig. 17). Ele é visto como uma espécie potencialmente aromática; o grau de aromaticidade desenvolvido por este sistema é dependente da contribuição da estrutura dipolar (II).



**Figura 17.** Formas ressonantes do heterociclo 2*H*-piran-2-ona.

A determinação dos parâmetros geométricos (comprimentos de ligação e ângulos) desta  $\alpha$ -pirona foi realizada com estudos de microondas (Tabela 2)<sup>(53)</sup>.

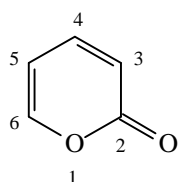
**Tabela 2.** Estimativas para as distâncias (Å) e ângulos de ligação (°) do heterociclo *2H*-piran-2-ona.



Distância (Å)	Ângulos (°)
O1-C2 = 1.390	C6-O1-C2 = 112,8
C2=O = 1.239	O1-C2-C3 = 119,5
C2-C3 = 1.478	C2-C3-C4 = 123,5
C3-C4 = 1.333	C3-C4-C5 = 116,5
C4-C5 = 1.470	C4-C5-C6 = 115,5
C5-C6 = 1.344	C5-C6-O1 = 132,2
C6-O1 = 1.350	O1-C2=O = 104,0
C-H = 1.080	C2-C3-H3 = 116,0
	C3-C4-H4 = 121,8
	H5-C5-C6 = 121,5
	H6-C6-O1 = 106,0

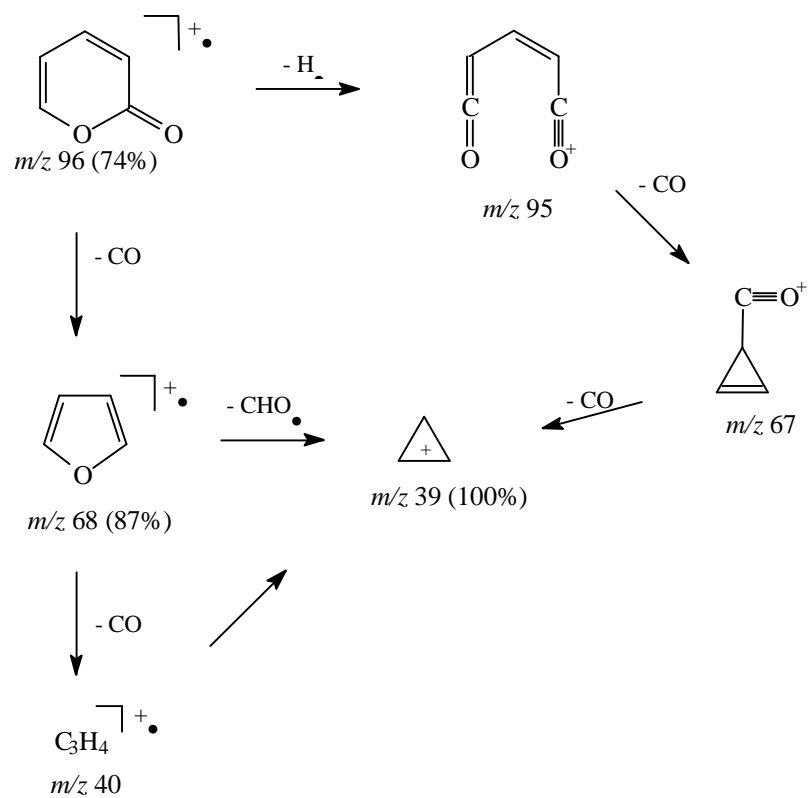
As propriedades espectroscópicas, mostradas na tabela a seguir, são consistentes com o caráter aromático do anel heteroatômico.

**Tabela 3.** Propriedades espectroscópicas do heterociclo 2*H*-piran-2-ona.



RMN $^{13}\text{C}$ em acetona- $d_6$		RMN $^1\text{H}$ em $\text{CDCl}_3$	
<b>C</b>	$\delta_{\text{C}}$ em ppm ( $^1J_{\text{CH}}$ , Hz)	<b>H</b>	$\delta_{\text{H}}$ em ppm ( $^3J_{\text{HH}}$ , Hz)
<b>2</b>	162.0	<b>3</b>	6.38 ( $J_{3,4} = 9.4$ )
<b>3</b>	116.7 (170)	<b>4</b>	7.56 ( $J_{3,4} = 9.4$ ; $J_{4,5} = 6.3$ )
<b>4</b>	144.3 (163)	<b>5</b>	6.43 ( $J_{4,5} = 6.3$ ; $J_{5,6} = 5.0$ )
<b>5</b>	106.8 (173)	<b>6</b>	7.77 ( $J_{5,6} = 5.0$ )
<b>6</b>	153.3 (200)		
<b>Infravermelho</b>		<b>Ultravioleta</b>	
Principal banda 1740-1720 $\text{cm}^{-1}$ ( $\nu_{\text{C=O}}$ )		216 nm 289 nm	

O Esquema I ilustra o modelo de fragmentação para o heterociclo 2*H*-piran-2-ona.



**Esquema I**

### **3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS**

#### **3.1. Objetivos**

##### **3.1.1. Objetivo geral**

O presente trabalho tem como objetivo principal o estudo fitoquímico sistemático da espécie vegetal *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (Polygalaceae).

##### **3.1.2. Objetivos específicos**

- a) Dar continuidade ao isolamento e identificação dos constituintes micromoleculares desta espécie vegetal como contribuição aos estudos quimiotaxonômicos da família Polygalaceae;
- b) Proceder a prospecção fitoquímica com biomonitoramento por ensaios biológicos de atividade tripanomicida com vistas a identificação de novos modelos para agentes antichagásicos;
- c) Introduzir esta mesma espécie vegetal em um novo programa de verificação das propriedades terapêuticas, agora para avaliação da atividade antinociceptiva do extrato bruto, frações solúveis e compostos puros.

### **3.2. Justificativas**

Em razão do amplo uso na medicina popular, principalmente no tratamento de doenças parasitárias, muitas das espécies do gênero *Polygala* (Polygalaceae) já foram alvos de estudos químicos e biológicos. As pesquisas revelaram uma grande variedade de metabólitos secundários e também confirmaram que tais plantas são fontes potenciais de substâncias farmacologicamente ativas. Portanto, a continuidade de trabalhos voltados a prospecção fitoquímica e avaliação das propriedades terapêuticas que envolvam espécies do referido gênero distribuídas na flora catarinense é de fundamental importância.

#### **3.2.1. Contribuição quimiotaxonômica**

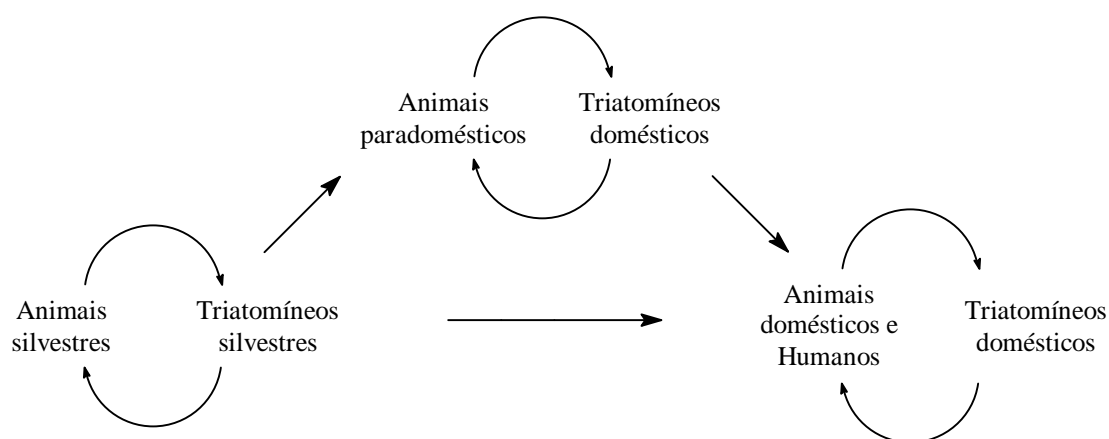
Em geral, os estudos fitoquímicos sistemáticos de espécies vegetais fornecem uma relação dos constituintes micromoleculares da planta-alvo, os quais são utilizados como caracteres pela taxonomia vegetal. Sendo assim, o primeiro critério que justifica o estudo químico de *Polygala sabulosa* A. W. Bennett é a contribuição aos aspectos quimiotaxonômicos da família Polygalaceae.

#### **3.2.2. A busca por novos modelos de agentes antichagásicos**

Doenças causadas por protozoários, tais como as tripanossomoses e leishmanioses, são uma constante ameaça, especialmente em regiões tropicais do planeta, onde são responsáveis por considerável morbidade e mortalidade.

A tripanossomose americana ou Doença de Chagas é uma zoonose típica do Continente Americano que se estende do sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile, com forte incidência no Brasil e tem como agente etiológico o flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermidade determina no homem quadros clínicos com características e conseqüências muito variadas, sendo observadas alterações anátomo- e fisiopatológicas inicialmente nas imediações dos olhos e mais tarde no sangue, no coração, no sistema digestivo e no sistema nervoso<sup>(54)</sup>.

Do ponto de vista epidemiológico, o desenvolvimento da endemia depende da circulação do *T. cruzi* nos ecossistemas silvestres, paredomésticos e domésticos (Fig. 13). O ciclo de propagação desse parasito tem como ponto de partida muitos mamíferos silvestres (por exemplo, os gambás, os tatus, etc.) que hospedam-no, servindo como “reservatórios” naturais do protozoário. Eventualmente, esses vertebrados podem ter seu sangue sugado por triatomíneos (grandes insetos conhecidos popularmente como “barbeiro”, “chupança”, “chupão”, etc.) com hábitos silvestres que seguramente irão contrair o parasito e mais tarde, devido aos seus deslocamentos no nicho ecológico, repassá-lo do mesmo modo a mamíferos que circulam nas imediações de vilarejos. Os triatomíneos domiciliares (principalmente *Triatoma infestans*), que encontram em habitações de barro, ainda hoje preservadas em algumas comunidades, um ecótopo propício ao seu desenvolvimento, receberão o parasito dos hospedeiros vertebrados intermediários e os transmitirão aos animais domésticos. Ainda que não bastasse a disseminação do parasito dentre os animais paredomésticos e domésticos, os humanos são também mais uma vítima a espreita da inoculação pelos “barbeiros”. As formas infectantes do *T. cruzi* (tripomastigotas metacíclicas), que estão contidas nas fezes dos insetos vetores, invadem o corpo humano através das mucosas e conjuntivas ou qualquer solução de continuidade da pele. Na maioria dos casos a infecção em humanos é decorrente da picada dos insetos para sua alimentação. Neste ou em um momento seguinte, os hemípteros costumam defecar e quando portadores do *T. cruzi* acabam por lançar o protozoário sobre a pele, que ao encontrar feridas e escoriações, causadas pelo ato de coçar motivado pela reação alérgica à saliva do triatomídeo, poderão penetrar facilmente no corpo humano. A cadeia de transmissão da parasitose infelizmente não acaba por aqui. Em regiões endêmicas ou em centros para onde afluem indivíduos contaminados, as transfusões de sangue constituem um sério fator de risco, quando não se realiza a seleção dos doadores ou a esterilização das amostras. A infecção por leite materno e pelo coito acontecem raramente<sup>(54)</sup>.



**Figura 18.** Ciclos que asseguram a circulação do protozoário *Trypanosoma cruzi* nos ecossistemas<sup>(54)</sup>.

A Medicina ainda não prescreve tratamento específico e eficaz para a condição do mal de Chagas. Isto significa que nenhuma droga submetida a ensaios clínicos até hoje apresentou capacidade curativa com isenção ou níveis reduzidos de efeitos colaterais e que não existem, também, processos de imunização para os indivíduos suscetíveis ao parasito. Por este motivo são inúmeros os grupos de pesquisa brasileiros, principalmente aqueles de Química de Produtos Naturais e de Síntese Orgânica associados com os de Parasitologia, que trabalham exaustivamente na obtenção de informações e recursos necessários ao descobrimento de moléculas úteis na terapêutica desta endemia. Enquanto isso, o controle da tripanossomose americana está baseado na interrupção do ciclo parasitário através das seguintes medidas preventivas: combate com agentes químicos aos triatomíneos em seus sítios de desenvolvimento dentro da área endêmica; promoção da melhoria do saneamento ambiental pela construção de habitações com condições mínimas de higiene para extinção do biótopo necessário ao surgimento de focos dos insetos vetores; educação das populações em zonas endêmicas para esclarecimento sobre as causas e conseqüências da doença; e profilaxia em bancos de sangue.

Em recente trabalho Pizzolatti e col.<sup>(55)</sup> destacaram, com base em evidências fornecidas por bioensaios contra a forma de cultura epimastigota de *T. cruzi*, as frações solúveis do extrato bruto de *Polygala sabulosa* como fontes potenciais de substâncias ativas contra o referido parasito. Isto foi suficiente para colocar a espécie em



significativa posição na busca por novos modelos de agentes antichagásicos, tornando-se assim um interessante alvo para outros estudos químicos e biológicos.

### **3.2.3. A busca por novos modelos de fármacos analgésicos**

Em vários casos, embora não em todos, a dor é uma experiência subjetiva associada à atividade elétrica em fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro de nervos periféricos. Esses nervos apresentam finas terminações sensoriais ramificadas nos tecidos periféricos e são ativados por estímulos de vários tipos (mecânicos, térmicos, químicos). Nem sempre associada à dor está a nocicepção, conceituada como o mecanismo pelo qual estímulos periféricos nocivos são transmitidos ao sistema nervoso central<sup>(56)</sup>.

Há muito se sabe que substâncias químicas, muitas até de origem natural, podem servir como agentes de controle da dor, sendo, portanto, denominadas drogas analgésicas. Devido a tal aplicação, a descoberta de novos candidatos a modelos de fármacos analgésicos é um tema de constante interesse.

## 4. SEÇÃO EXPERIMENTAL

### 4.1. Estudo fitoquímico sistemático

#### 4.1.1. Materiais e Métodos

Todos os solventes utilizados foram de grau P.A., sendo adquiridos de fontes comerciais. Os solventes não sofreram qualquer tipo de purificação prévia. Nos fracionamentos e separações por cromatografia em coluna foi utilizado sílica gel Merck de granulação 70-230 mesh (0,063-0,2 mm). Para realização das análises por cromatografia em camada delgada foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel Merck com espessura de 0,2 mm. A revelação das substâncias nas placas cromatográficas foi realizada por irradiação ultravioleta com comprimentos de onda de 254 e 365 nm, e/ou por exposição a vapores de iodo, e/ou imersão em solução aquosa de cloreto férrico e/ou imersão em solução de anisaldeído sulfúrico seguida de aquecimento a 110°C. Todas as misturas de solventes empregadas como eluentes foram preparadas a volume por volume (v/v).

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Microquímica APF-301 e não sofreram correções.

Os espectros de absorção na região do infravermelho, entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , foram registrados em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FT 16PC utilizando-se pastilhas compactas de brometo de potássio (KBr) de grau analítico. Os comprimentos de onda das absorções foram medidos em centímetros recíprocos ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram obtidos a 200 MHz em um espectrômetro Bruker AC-200 F, sendo os deslocamentos químicos medidos em unidades adimensionais  $\delta$  (ppm) e tendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. As áreas relativas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades são descritas como: *s* (singleto), *d* (dupleto), *t* (triplete), *dd* (duplo dupleto), *sl* (singleto largo), *dl* (dupleto largo) e *m* (multiplete).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 foram obtidos a 50 MHz e 75 MHz em espectrômetros Bruker AC-200 F e Varian Gemini 300,

respectivamente, sendo os deslocamentos químicos medidos em unidades adimensionais  $\delta$  (ppm) e tendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os mesmos equipamentos foram utilizados na aquisição dos espectros de DEPT-135.

Os espectros de massas foram adquiridos em um aparelho Shimadzu QP-2000 sob impacto de feixe eletrônico a 70 eV. Os cromatogramas de íons totais e os respectivos espectros de massas foram obtidos em um aparelho Shimadzu CG-MS-QP-2000 (coluna apolar CBP1, 25 m x 0,25 mm. Ti = 80 °C [4 min.], taxa 5°C/min., Tf = 300 °C [30 min.]).

#### **4.1.2. Coleta e Identificação da planta**

A espécie vegetal *Polygala sabulosa* A. W. Bennet foi coletada no município de Rancho Queimado, pertencente ao estado de Santa Catarina (Brasil), em Novembro de 1997. A planta foi identificada pelo Prof. Dr. Olavo de Araújo Guimarães e uma excisada da espécie foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná sob o número 19640<sup>(31)</sup>.

#### **4.1.3. Procedimento padrão de cromatografia por adsorção em coluna**

O empacotamento das colunas cromatográficas foi realizado de acordo com o procedimento descrito na literatura<sup>(57)</sup>. O conteúdo das frações submetidas à cromatografia em coluna de sílica gel era inicialmente dissolvido em acetona e transferido para um balão. Em seguida, adicionava-se sílica gel na proporção 1:2 (m/m) e evaporava-se cuidadosamente o solvente sob vácuo a 50°C em rotavapor até se obter uma mistura seca e homogênea, que posteriormente era aplicada no topo de uma coluna já empacotada com a fase estacionária. A eluição era realizada pelo modo gradiente de polaridade crescente com eluentes de proporções definidas preparados a v/v. As frações coletadas eram evaporadas em rotavapor sob vácuo a 50°C até 1/10 de seus volumes iniciais, estocadas em frascos adequados e imediatamente analisadas por CCD.

#### **4.1.4. Procedimento padrão de isolamento**

As frações resultantes de processos cromatográficos que continham sólidos eram lavadas com um pequeno volume de um solvente apropriado (geralmente acetona ou misturas de hexano e acetato de etila) sob leve aquecimento. Após alguns minutos em repouso o sobrenadante era removido cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Este procedimento era repetido até que o sólido apresentava-se livre de pigmentos e óleos. Quando necessário, em seguida realizava-se uma efetiva recristalização do material em solvente adequado. O sólido isolado era mantido em dessecador a vácuo contendo cloreto de cálcio anidro por vinte e quatro horas. Finalmente, determinava-se o ponto de fusão da amostra e posteriormente a submetia às análises espectrométricas.

#### **4.1.5. Preparação do extrato bruto de *P. sabulosa***

O material vegetal seco e triturado (todas as partes da planta, 623 g) foi extraído por maceração exaustiva com etanol-água (4:1) a temperatura ambiente. A solução hidroalcoólica resultante foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida a 50°C em rotavapor para fornecer o extrato bruto hidroalcoólico (210 g)<sup>(31)</sup>.

#### **4.1.6. Preparação das frações de *P. sabulosa* (pré-fracionamento A)**

Uma suspensão aquosa (200 mL) do extrato bruto (40 g) foi submetida a particionamento sucessivo com *n*-hexano (3 x 100 mL), diclorometano (3 x 100 mL), acetato de etila (3 x 100 mL) e *n*-butanol (3 x 100 mL). O solvente de cada fase orgânica foi destilado sob vácuo a 50°C para obtenção das respectivas frações solúveis do extrato bruto (Fluxograma 1). (fração em hexano: 7 g; fração em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 12,0 g; fração em AcOEt: 7,3 g; fração em *n*-BuOH: 8 g.)

#### 4.1.7. Preparação das frações de *P. sabulosa* (pré-fracionamento B)

O extrato bruto (169 g) foi dissolvido em acetona, adicionou-se sílica gel (300 g) e evaporou-se o solvente em rotavapor sob pressão reduzida a 50°C até se obter uma mistura seca e homogênea. A pastilha obtida foi aplicada em uma coluna com diâmetro de 5,0 cm e eluída exaustivamente com *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, nesta seqüência. Os solventes das fases orgânicas foram evaporados sob vácuo a 50°C para resultar nas respectivas frações solúveis do extrato bruto (Fluxograma 1, pág. 49). (fração em hexano: 16 g; fração em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 14,2 g; fração em AcOEt: 13,9 g; fração em EtOH: 15 g.)<sup>(31)</sup>

#### 4.1.8. Isolamento dos constituintes químicos da fração solúvel em diclorometano obtida no pré-fracionamento A.

A fração solúvel em diclorometano (11,3 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel ( $h = 30$  cm;  $\phi = 3$  cm) usando-se como eluente misturas de *n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:AcOEt. Um total de 127 frações de 50 mL foram coletadas e tiveram seus volumes reduzidos. Em seguida as mesmas foram combinadas com base na análise por CCD, e então:

- a) a fração 14 forneceu o composto **1** (15 mg) após realização do procedimento padrão de isolamento e recristalização com acetona;
- b) o combinado das frações 45-48 foi dissolvido em AcOEt (50 mL) e a solução resultante foi tratada com carvão ativo (1 g) sob agitação mecânica e aquecimento brando; a solução foi filtrada, seca em sulfato de sódio anidro e evaporada para render o composto **2** (400 mg);
- c) a fração 50 forneceu o composto **5** (23 mg) após realização do procedimento padrão de isolamento;
- d) o combinado das frações 52-56 foi recromatografado em coluna de sílica gel ( $h = 20$  cm;  $\phi = 2$  cm) usando-se como eluente misturas de *n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:AcOEt; os compostos **3** (15 mg) e **6** (5 mg) foram obtidos das frs. 7 e 15-17, respectivamente, após realização do procedimento padrão de isolamento;
- e) o combinado das frações 80-97 foi recromatografada em coluna de sílica gel ( $h = 25$  cm;  $\phi = 3$  cm) com o mesmo eluente citado no item anterior; após a realização do

procedimento descrito na seção 4.1.4 obteve-se: o composto **4** (400 mg) do combinado das frs. 11-12; uma mistura dos compostos **7** e **8** da fr. 13; o composto **7** da fr. 14 (15 mg); o composto **9** (185 mg) da união das frs.15-16; e a substância **10** (4 mg) das frs. 18-19.

O Fluxograma 2 (pág. 50) apresenta a seqüência experimental seguida para o isolamento dos constituintes químicos dessa fração.

#### **4.1.9. Isolamento dos constituintes químicos da fração solúvel em acetato de etila obtida no pré-fracionamento A.**

A fração do extrato bruto solúvel em acetato de etila (7,3 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel ( $h = 25$  cm;  $\phi = 3$  cm) utilizando-se como eluente misturas de  $n$ -C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:AcOEt:MeOH. Foram coletadas 36 frações de 50 mL que tiveram seus volumes reduzidos e logo após foram reunidas com base na análise por CCD. Então:

- a) o combinado das frações 15-17 rendeu o composto **11** (4 mg) após aplicação do procedimento padrão de isolamento; e
- b) o combinado das frações 18-19 foi filtrado em coluna de Sephadex LH-20 usando metanol como eluente; 12 frações de 10 mL foram coletadas e da combinação das subfrações 9-11 o composto **12** (25 mg) foi obtido após a evaporação do solvente.

O Fluxograma 3 (pág. 51) apresenta a seqüência experimental seguida para o isolamento dos constituintes químicos dessa fração.

#### **4.1.10. Isolamento dos constituintes químicos da fração solúvel em etanol obtida no pré-fracionamento B.**

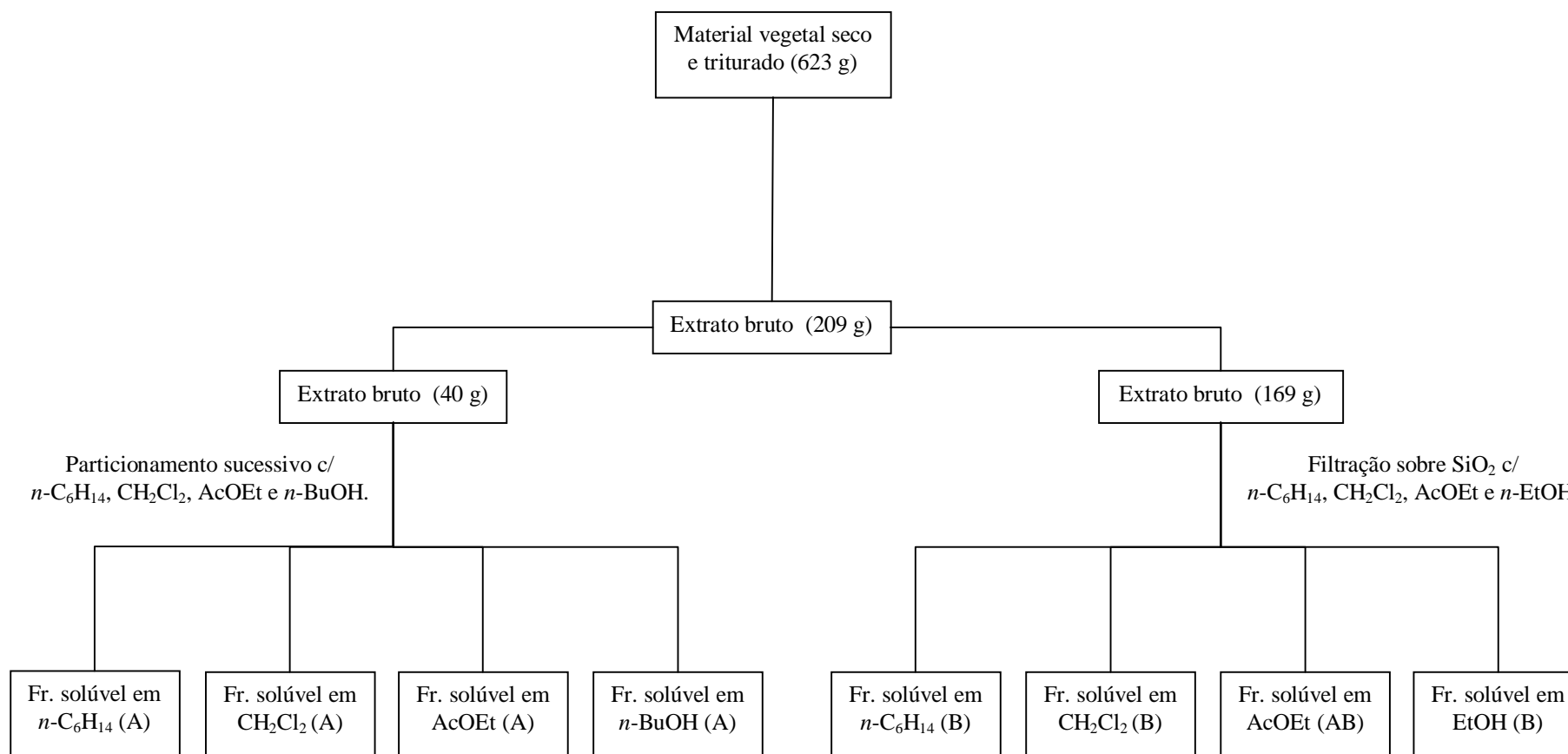
A fração do extrato bruto solúvel em etanol (15 g) foi dissolvida em acetona, adicionou-se sílica gel e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida a 50°C em rotavapor até se obter uma mistura seca e homogênea. A pastilha resultante foi aplicada em uma coluna com diâmetro de 5,0 cm e eluída com diclorometano e misturas de AcOEt:EtOH:AcOH com polaridade crescente, sendo obtidas 20 frações de 200 mL cada que tiveram seus volumes reduzidos.

A fração 15 foi cromatografada em coluna de sílica gel ( $h = 25$  cm;  $\phi = 2$  cm) utilizando-se como eluente misturas de  $n\text{-C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}:\text{EtOH}$ . Foram coletadas 63 frações de 50 mL que tiveram seus volumes reduzidos e foram agrupadas com base na análise por CCD. Então:

- a) o combinado das frações 40-43 foi recromatografada em coluna de sílica gel ( $h = 20$  cm;  $\phi = 2$  cm) usando-se misturas de  $\text{AcOEt}:\text{EtOH}$ ; o composto **13** (32 mg) foi obtido da combinação das frações 8-9 após evaporação do solvente.

O Fluxograma 4 (pág. 51) apresenta a seqüência experimental seguida para o isolamento do glicosídeo **13**.

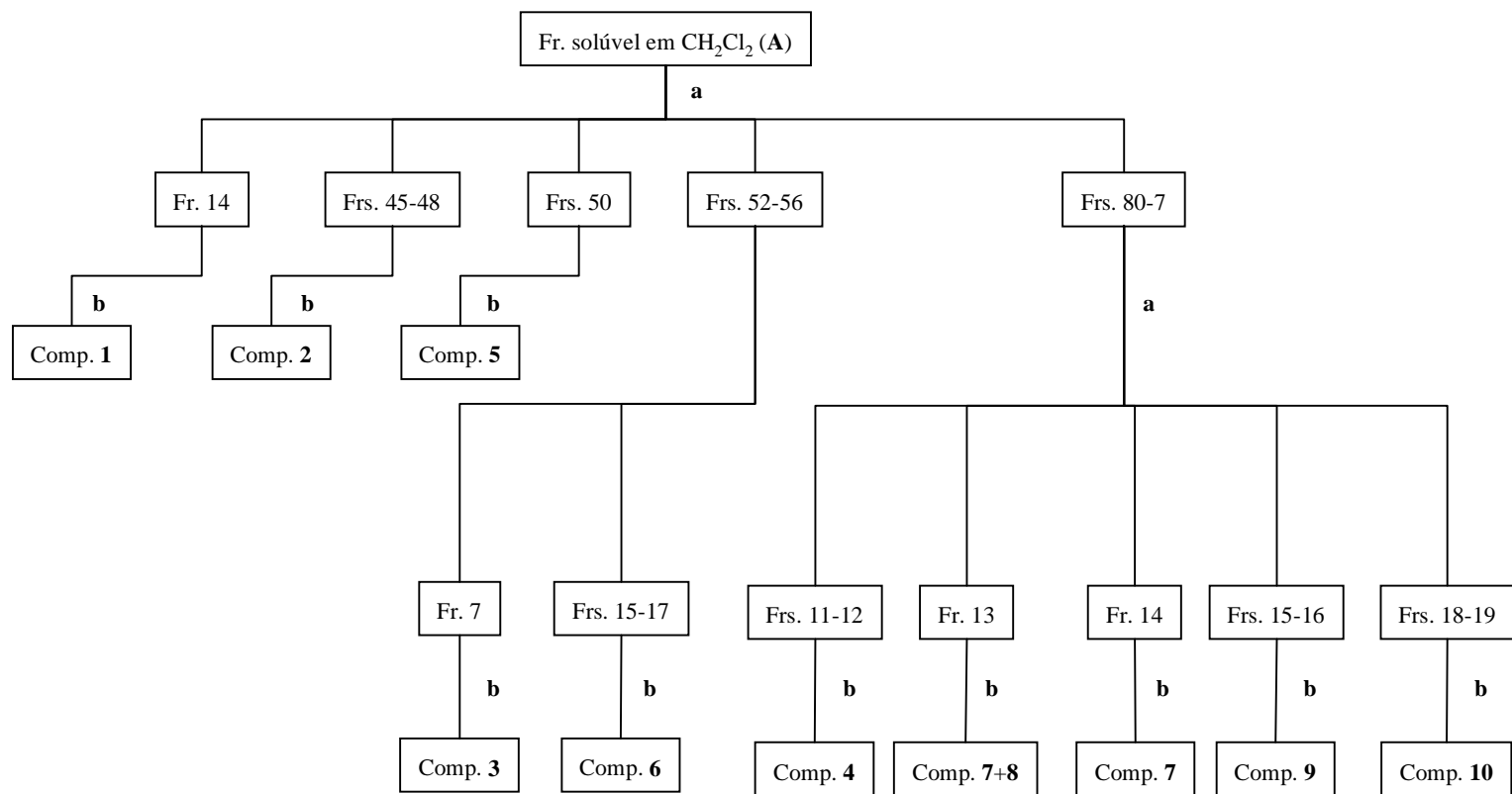
### *Fluxograma 1*



Fluxograma que apresenta o modo de preparação das frações solúveis do extrato bruto de *P. sabulosa*.



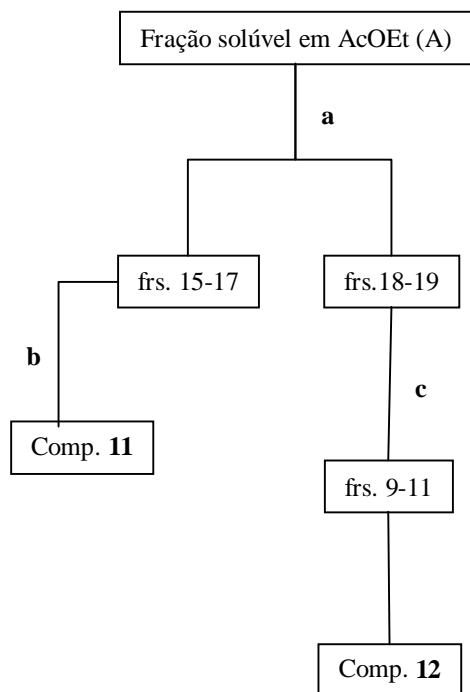
## Fluxograma 2



Fluxograma que apresenta a sequência de isolamento dos constituintes químicos presentes na fração do extrato bruto solúvel em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (A).

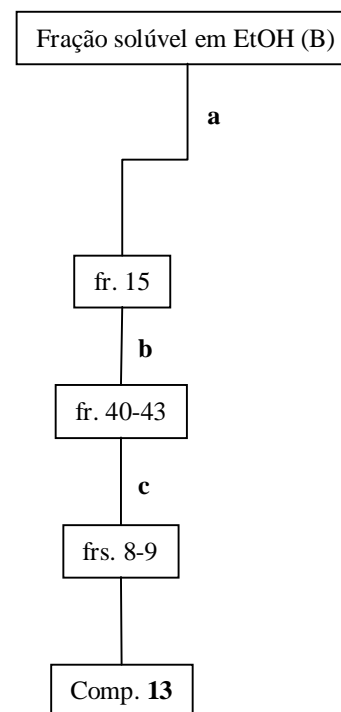
**a:** cromatografia em coluna de  $\text{SiO}_2$  usando-se como eluente misturas de  $n\text{-C}_6\text{H}_{14}:\text{AcOEt}$ ; **b:** procedimento padrão de isolamento (seção 4.1.4).

### Fluxograma 3



Fluxograma que apresenta a sequência de isolamento dos constituintes químicos presentes na fração do extrato bruto solúvel em AcOEt (B). **a**: cromatografia em coluna de SiO<sub>2</sub> usando-se como eluente misturas de *n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:AcOEt; **b**: procedimento padrão de isolamento (seção 4.1.4); **c**: filtração em Sephadex LH-20 com metanol

### Fluxograma 4



Fluxograma que apresenta a sequência de isolamento dos constituintes químicos presentes na fração do extrato bruto solúvel em EtOH (A). **a**: filtração sob SiO<sub>2</sub> com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e misturas de AcOEt:EtOH:AcOH; **b**: CC de SiO<sub>2</sub> usando-se como eluente misturas de *n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:AcOEt:EtOH; **c**: CC de SiO<sub>2</sub> usando-se como eluente misturas de AcOEt:EtOH

#### 4.1.11. Caracterização dos constituintes químicos

##### 24-etil-5 $\alpha$ -colesta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (1)

PF: 167-169°C. I.V.(KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3424, 2936, 2868, 1456, 1380, 1040, 970. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 5.14 (m, 3H, H-7, H-22 e H-23), 3.60 (m, H-3), 1.03 (d,  $J = 6.6$ , 21- $\text{CH}_3$ ), 0.85 (d,  $J = 6.0$ , 26- $\text{CH}_3$ ), 0.80 (s, 19- $\text{CH}_3$ ), 0.80 (d,  $J = 6.3$ , 27- $\text{CH}_3$ ), 0.79 (t,  $J = 6.2$ , 29- $\text{CH}_3$ ), 0.55 (s, 18- $\text{CH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 140.3 (C-8), 138.9 (C-22), 130.1 (C-23), 118.1 (C-7), 71.8 (C-3), 56.6 (C-17), 55.8 (C-14), 51.9 (C-24), 50.1 (C-9), 43.9 (C-13), 41.5 (C-20), 40.9 (C-5), 40.2 (C-12), 38.7 (C-4), 37.8 (C-1), 34.9 (C-10), 32.6 (C-25), 32.1 (C-2), 30.3 (C-6), 29.2 (C-16), 26.1 (C-28), 23.7 (C-15), 22.2 (C-11), 22.1 (C-21), 21.8 (C-26), 19.7 (C-27), 13.8 (C-19), 12.9 (C-29), 12.7 (C-18). EMIE (probe) 70 eV,  $m/z$  (int. rel.): 412  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (11), 397 (5), 369 (6), 351 (3), 300 (10), 271 (68), 255 (33), 107 (47), 81 (100), 69 (61).

##### 7-(3',3'-dimetilaliloxi)-6-metoxicumarina (2)

PF: 79,5-82°C. I.V.(KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3054, 3008, 2974, 2936, 1714, 1614, 1562, 1514, 1448, 1426, 1382, 1280, 1248, 1198, 1172, 1142, 1026. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  ppm: 7.86 (1H, d,  $J = 9.47$  Hz, H-4), 7.16 (1H, s, H-8), 6.94 (1H, s, H-5), 6.20 (1H, d,  $J = 9.55$  Hz, H-3), 5.52 (1H, t,  $J = 6.65$  Hz, H-2'), 4.69 (2H, d,  $J = 6.64$  Hz, H-1'), 3.85 (3H, s, 6-O $\text{CH}_3$ ), 1.79 (6H, s, H-4' e H-5'). RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 161.7 (C-2), 152.2 (C-7), 149.9 (C-10), 146.7 (C-6), 143.4 (C-4), 139.1 (C-3'), 118.6 (C-2'), 113.3 (C-3), 111.3 (C-9), 107.9 (C-5), 101.1 (C-8), 66.3 (C-1'), 56.4 (O $\text{CH}_3$ ), 25.9 (C-4'), 18.4 (C-5'). EMIE (probe) 70 eV,  $m/z$  (int. rel.): 260  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (2), 192 (100), 177 (33), 164 (22), 69 (89).

##### 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxo-dihidroestiril)-2H-piran-2-ona (3)

PF: 137-140°C. I.V.(KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3106, 2926, 1710, 1648, 1568, 1490, 1458, 1442, 1412, 1354, 1332, 1270, 1242, 1146, 1032, 922, 870, 824. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 4, pág. 74. RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 4, pág. 74. EMIE (probe) 70 eV,  $m/z$  (int. rel.): 274  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (9), 135 (100), 69 (13).

**4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-14-metoxi-dihidroestiril)-2H-piran-2-ona (4)**

PF: 148-151°C. I.V.(KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3078, 2950, 2900, 2848, 1726, 1646, 1568, 1508, 1454, 1408, 1256, 1194, 1160, 1134, 1036, 996, 934, 856, 838. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 4, pág. 74. RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 4, pág. 74. EMIE (probe) 70 eV,  $m/z$  (int. rel.): 304  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (10), 165 (100), 135 (15), 69 (23).

**4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-10,14-dimetoxi-dihidroestiril)-2H-piran-2-ona (5)**

PF: 165,5-168°C. I.V.(KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3080, 2952, 1726, 1648, 1572, 1500, 1478, 1416, 1330, 1254, 1224, 1202, 1158, 1118, 1074, 1036, 1006, 938. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 4, pág. 74. RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 4, pág. 74. EMIE (probe) 70 eV,  $m/z$  (int. rel.): 334  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (4), 195 (100), 165 (9), 69 (12).

**4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-estiril)-2H-piran-2-ona (6)**

PF: 198-201°C. I.V.(KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3076, 2922, 2852, 1722, 1634, 1610, 1552, 1496, 1450, 1412, 1364, 1312, 1258, 1198, 1158, 1104, 1030, 1004, 960, 924, 828, 812. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 5, pág. 83. RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 5, pág. 83. EMIE (probe) 70 eV,  $m/z$  (int. rel.): 272  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (100), 244 (27), 201 (87), 115 (36), 89 (57), 69 (95).

**4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-14-metoxi-estiril)-2H-piran-2-ona (7)**

PF: 186-189°C. I.V.(KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3078, 2954, 2898, 1728, 1630, 1616, 1556, 1484, 1450, 1414, 1356, 1324, 1254, 1224, 1198, 1154, 1112, 1076, 1052, 1038, 1002, 958, 936, 842, 810. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 5, pág. 83. RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 5, pág. 83. EMIE (probe) 70 eV,  $m/z$  (int. rel.): 302  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (100), 271 (20), 229 (29), 125 (38), 69 (83).

**4-metoxi-6-(11,12-dimetoxi-estiril)-2H-piran-2-ona (9)**

PF: 147-149°C. I.V.(KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3078, 2942, 2836, 1702, 1638, 1596, 1552, 1516, 1450, 1408, 1254, 1152, 1018, 956, 818, 754. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 5, pág. 83. RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 5, pág. 83. EMIE (probe) 70 eV,  $m/z$  (int. rel.): 288  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (100), 245 (25), 217 (57), 69 (58).

**5,7,4'-trihidroxi-flavona (11)**

PF: 344-345°C. I.V.(KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3412, 1652, 1614, 1568, 1518, 1502, 1426, 1394, 1360, 1310, 1274, 1258, 1204, 1178, 1144, 1042, 912, 884, 840, 818. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 6, pág. 93. EMIE (probe) 70 eV,  $m/z$  (int. rel.): 270  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (100), 153 (55), 152 (27), 118 (22), 69 (13).

**3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona (12)**

PF: 312-313°C. I.V.(KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3408, 1666, 1610, 1562, 1522, 1452, 1382, 1320, 1264, 1200, 1168, 1014, 822. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 6, pág. 93. EMIE (probe) 70 eV,  $m/z$  (int. rel.): 302  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (100), 301 (33), 153 (16), 137 (27), 69 (40).

**3-O-( $\beta$ -D-glicopiranosil)-5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona (13)**

PF: 247-249°C. I.V.(KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3320, 1658, 1606, 1562, 1506, 1452, 1364, 1262, 1204, 1172, 1132, 1084. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm: ver Tabela 6, pág. 93. RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm: compatíveis com valores descritos na literatura<sup>(58)</sup>. EMIE (probe) 70 eV,  $m/z$  (int. rel.): 302  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (100), 301 (27), 153 (12), 137 (17), 69 (34).

## 4.2. Ensaios biológicos

### 4.2.1. Atividade tripanomicida

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Protozoologia (Departamento de Microbiologia e Parasitologia) da UFSC.

Soluções estoque do extrato bruto, ou frações, ou compostos puros foram preparadas em DMSO na concentração de 20 mg/mL e filtradas em membrana de 0.45  $\mu$ m.

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram cultivadas em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os parasitas foram lavados em salina estéril fosfato tamponada (PBS – pH 7,2) e sua concentração ajustada para  $5 \times 10^6$  parasitas/mL no mesmo meio. Os bioensaios foram realizados em triplicata em placas contendo 96 poços. Nos poços foram colocados 200  $\mu$ l da suspensão de parasita juntamente com soluções do extrato bruto ou frações a 500, 250, 100, 50 e 10  $\mu$ g/mL. Como controle, epimastigotas foram incubados com solução de DMSO a 5% contendo 10  $\mu$ g/mL de benzidazol (Rochagan<sup>®</sup>) ou em meio LIT somente. Após a incubação a 27°C por 72 horas, a atividade tripanomicida foi avaliada pela determinação do número de parasitas vivos em câmara de Neubauer.

O extrato bruto e frações solúveis foram ensaiados em triplicata contra a forma sangüínea tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. As formas tripomastigotas sangüíneas foram obtidas de ratos Swiss infectados, no sétimo dia de infecção com *T. cruzi* (Y cepa). Após a coleta do sangue, o número de parasitas foi determinado em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para  $5 \times 10^5$  parasitas/mL em meio LIT. Em seguida, 200  $\mu$ l da suspensão de parasitas foram incubados com soluções do extrato bruto (100 e 500  $\mu$ g/mL) ou frações (250 e 500  $\mu$ g/mL) a 4°C por 48 horas. Paralelamente como controle, o mesmo número de parasitas foi incubado com solução de DMSO a 5% contendo violeta de genciana (250  $\mu$ g/mL) ou com meio LIT somente. A atividade tripanomicida foi avaliada pela determinação do número de formas tripomastigotas vivas. A atividade foi expressa como percentagem de redução do número de parasitas.

#### **4.2.2. Atividade antinociceptiva**

Os ensaios foram realizados no Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da UNISUL.

Foram utilizados camundongos suíços machos (25-35 g, n = 6-8 por grupo). A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético a 0,6%. As respostas consistem em contrações do músculo abdominal do animal.

Os animais, excluídos os indivíduos que constituem o grupo controle, foram tratados 30 minutos antes da injeção de ácido acético com o extrato bruto, frações solúveis e compostos puros pela via intraperitoneal nas doses de 10, 30 e 100 mg/Kg, respectivamente.

Após a injeção da substância irritante, pares de animais foram separados em caixas de observação e as contorções abdominais indicativas de dor foram contadas cumulativamente durante um período de 20 minutos. A atividade antinociceptiva foi demonstrada pela diminuição do número de contorções nos animais pré-tratados em relação aos animais usados como controle, sendo expressa na forma de porcentagem de inibição do número de contorções e  $DI_{50}$  (mg/Kg).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Estudo fitoquímico sistemático de *P. sabulosa* (Polygalaceae)

O estudo fitoquímico sistemático da espécie vegetal *Polygala sabulosa* A. W. Bennet (Polygalaceae) foi realizado de acordo com a metodologia tradicional. Os constituintes micromoleculares foram isolados através da aplicação da técnica de cromatografia por adsorção em coluna à frações solúveis do extrato bruto obtidas tanto por extração líquido-líquido quanto por sólido-líquido. Procedeu-se com eluição pelo modo gradiente e posterior monitoramento das subfrações resultantes por cromatografia em camada delgada.

Os constituintes químicos isolados tiveram suas estruturas estabelecidas com base em evidências espectroscópicas (espectrometria de massas por impacto eletrônico, espectrometria no infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono-13), envolvendo inclusive comparação com dados relatados na literatura. É importante ressaltar que o composto **8** apresentou-se como constituinte minoritário e foi previamente caracterizado por CGAR-EM.

Os sucessivos fracionamentos cromatográficos sobre sílica gel da fração do extrato bruto de *P. sabulosa* solúvel em diclorometano levaram ao isolamento de dez substâncias naturais, que foram identificados como 24-etil-5 $\alpha$ -colesta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (**1**), 7-(3',3'-dimetilaliloxi)-6-metoxicumarina (**2**), 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxidihidroestiril)-2*H*-piran-2-ona (**3**), 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-14-metoxidihidroestiril)-2*H*-piran-2-ona (**4**), 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-10,14-dimetoxidihidroestiril)-2*H*-piran-2-ona (**5**), 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-estiril)-2*H*-piran-2-ona (**6**), 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-14-metoxi-estiril)-2*H*-piran-2-ona (**7**), 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-10,14-dimetoxi-estiril)-2*H*-piran-2-ona (**8**), 4-metoxi-6-(11,12-dimetoxi-estiril)-2*H*-piran-2-ona (**9**) e protohypericin (**10**). Os flavonóides 5,7,4'-trihidroxiflavona (**11**) e 3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona (**12**) foram obtidos a partir dos consecutivos fracionamentos cromatográficos da porção do extrato bruto hidroalcoólico de *P. sabulosa* solúveis em acetato de etila. Da mesma maneira o glicosídeo flavonoídico 3-*O*-( $\beta$ -D-glicopiranosil)-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona (**13**) foi isolado da fração solúvel em etanol.



A seguir é apresentada uma discussão detalhada de como cada constituinte químico foi devidamente identificação e caracterizado.

#### 5.1.1. 24-Etil-5 $\alpha$ -colesta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (**1**)

O produto natural 24-etil-5 $\alpha$ -colesta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (**1**), mais conhecido como  $\alpha$ -espinasterol, foi obtido na forma de pequenas agulhas brancas com ponto de fusão 167°C-169°C e está sendo descrito pela primeira vez como constituinte químico de *P. sabulosa* (Polygalaceae). Contudo, trabalhos anteriores já reportaram a presença desse fitoesterol em outras duas espécies da família Polygalaceae (*P. paniculata* e *P. cyparissias*)<sup>(25,39)</sup>.

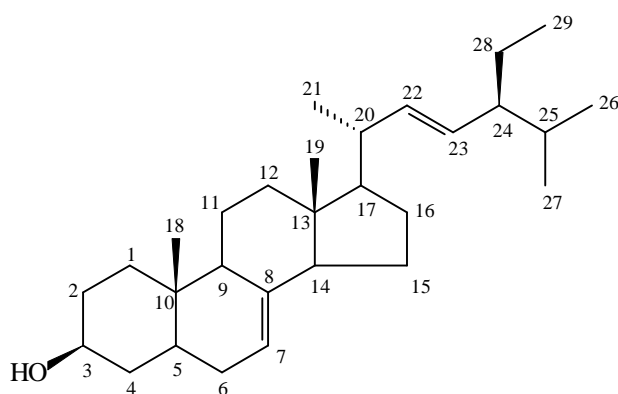
Os espectros na região do I.V. e de RMN  $^1\text{H}$  de **1** apresentaram um perfil característico de substância esteroideal. No primeiro, destacaram-se as intensas e moderadas bandas de absorção em frequências de deformações axiais e angulares de grupos metil e metileno ( $\nu_{\text{máx}}$  2936, 2868, 1456 e 1380  $\text{cm}^{-1}$ ). Além disso, foram observadas absorções em 3424  $\text{cm}^{-1}$ , 1642  $\text{cm}^{-1}$  e 1040  $\text{cm}^{-1}$  que são próprias de vibrações de deformação axial de ligações O—H, C=C e C—O, respectivamente. No segundo tipo de espectro notou-se um conjunto de sinais para três hidrogênios olefínicos ( $\delta_{\text{H}}$  5.0-5.5 ppm) e para um hidrogênio carbinólico ( $\delta_{\text{H}}$  3.5-4.0 ppm), além de um conjunto complexo de sinais na região de alifáticos, onde foi possível o reconhecimento de duas metilas ligadas a carbono quaternário, em  $\delta_{\text{H}}$  0.55 ppm (3H, s) e  $\delta_{\text{H}}$  0.80 ppm (3H, s), e três metilas dupletos [1.03 (d,  $J$  = 6.6, 21-CH<sub>3</sub>), 0.85 (d,  $J$  = 6.0, 26-CH<sub>3</sub>), 0.80 (d,  $J$  = 6.3, 27-CH<sub>3</sub>)].

A comparação dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  obtido sem acoplamento de hidrogênio e RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT permitiu o reconhecimento de vinte e nove sinais relacionados aos seguintes tipos de átomos de carbono: um  $sp^2$  quaternário ( $\delta_{\text{C}}$  140.3 ppm), três  $sp^2$  secundários ( $\delta_{\text{C}}$  138.9, 130.1 e 118.1 ppm), um  $sp^3$  carbinólico ( $\delta_{\text{C}}$  71.8 ppm), dois  $sp^3$  quaternários ( $\delta_{\text{C}}$  43.9 e 34.9 ppm) e nove  $sp^3$  secundários ( $\delta_{\text{C}}$  40.2, 38.7, 37.8, 32.1, 30.3, 29.2, 26.1, 23.7 e 22.2 ppm). Os treze sinais adicionais ( $\delta_{\text{C}}$  56.6, 55.8, 51.9, 50.1, 41.5, 40.9, 32.6, 22.1, 21.8, 19.7, 13.8, 12.9 e 12.7 ppm) corresponderam a átomos de carbono  $sp^3$  primários e terciários. Essas informações foram suficientes para

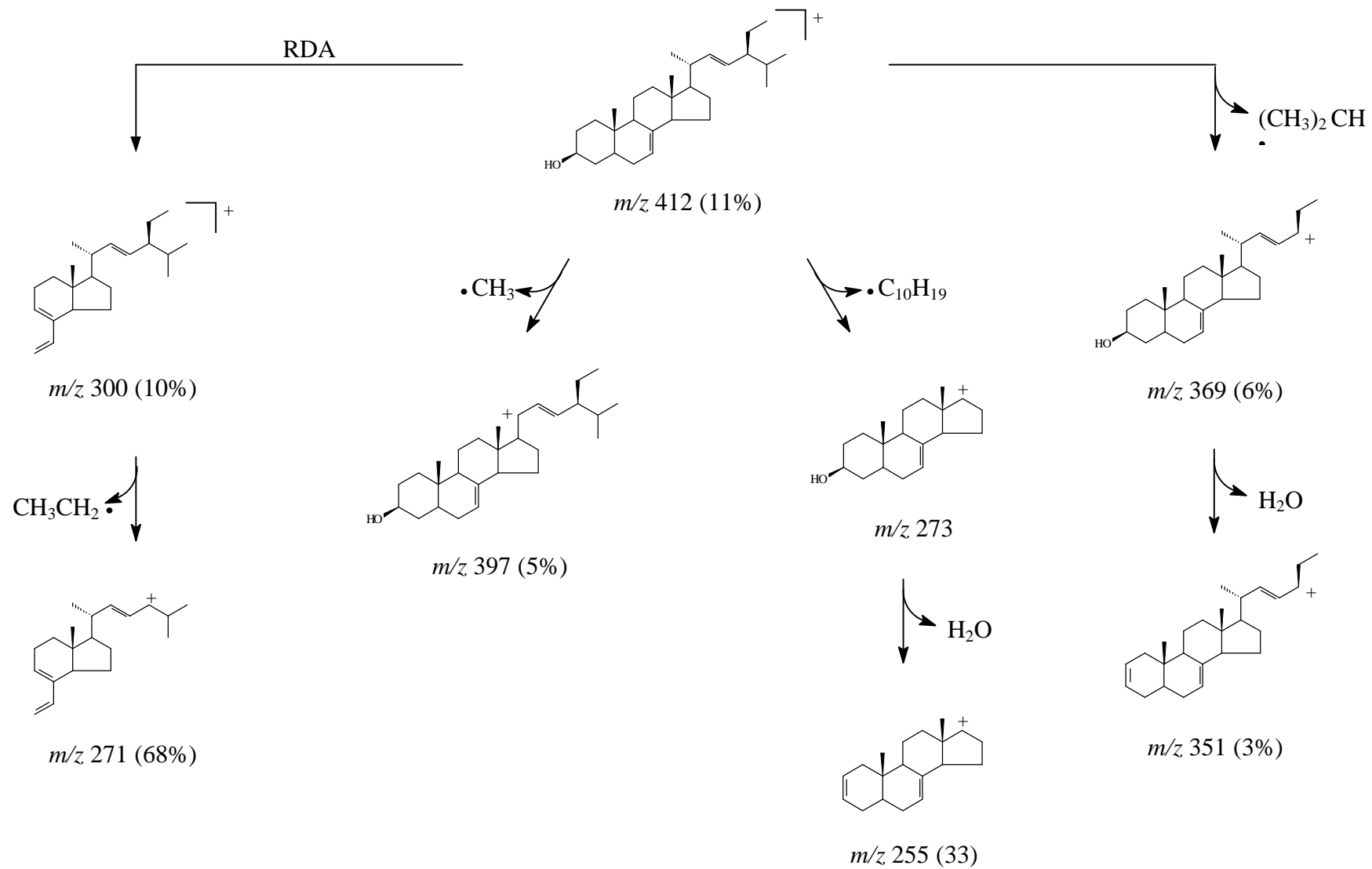
suportar a hipótese de um esqueleto esteroidal que contém, segundo a quantidade de átomos de carbono olefínicos, duas duplas ligações.

O EMIE de **1** mostrou o pico correspondente ao íon molecular  $[M]^{+\bullet}$  em  $m/z$  412 u.m.a. (11%), conferindo com a fórmula molecular  $C_{29}H_{48}O$ . A relação entre o número de átomos de carbono e hidrogênio indicou a presença de seis insaturações na molécula. Os picos em  $m/z$  397 u.m.a. (5%) e em 369 u.m.a. (11%) puderam ser relacionados a fragmentos iônicos resultantes da perda de radical metil  $[M-CH_3]^{+\bullet}$  e isopropil  $[M-C_3H_{10}]^{+\bullet}$  diretamente do íon molecular, respectivamente, e são típicos de esteróides com insaturação entre C-22 e C-23. O íon fragmentário com  $m/z$  300 u.m.a. (10%) é proveniente de um processo retro Diels-Alder que ocorre, seguramente, no anel B do sistema cíclico e a sua presença no espectro de massas foi decisiva para localizar a segunda insaturação em C-7 e C-8. O modelo de fragmentação está representado no Esquema I.

Frente a essas informações experimentais o composto **1** teve sua estrutura proposta como 24-etil-5 $\alpha$ -colesta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol. A confirmação desta dedução foi obtida a partir da comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono da amostra com os valores descritos por Kojima e col.<sup>(59)</sup>, tendo como consequência a correta atribuição desses sinais (*vide* seção 4.1.11, pág 51).



**1**



**Esquema I**

### 5.1.2. 7-(3',3'-Dimetilaliloxi)-6-metoxicumarina (2)

A ocorrência natural da 7-(3',3'-dimetilaliloxi)-6-metoxicumarina (2) foi observada pela primeira vez na espécie vegetal *Carduus tenuiflorus* (Compositae)<sup>(60)</sup>, e mais recentemente constatou-se a sua presença em *Polygala sabulosa* (Polygalaceae)<sup>(31)</sup>.

No atual estudo essa preniloxicumarina foi novamente obtida como um constituinte majoritário da espécie *P. sabulosa* e poder-se-ia dar como irrelevante tal registro. Entretanto, dois fatos justificaram a repetição do relato e a apresentação de uma descrição detalhada da identificação dessa cumarina hemiterpênica. Primeiramente, confirmou-se a presença em quantidades apreciáveis dessa substância nos tecidos vegetais da espécie, indicando que a planta é uma fonte natural do metabólito; em segundo lugar, informações providenciadas por ensaios biológicos, que serão apresentadas em páginas posteriores, comprovaram a potencialidade dessa substância como agente antichagásico.

Inicialmente, a fórmula molecular do composto 2 foi deduzida como C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub> (que confere com oito insaturações) com base nos espectros de massas e de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. A informação útil para este fim contida no EMIE foi a presença do pico referente ao íon molecular [M]<sup>+</sup>• de *m/z* 260 u.m.a. (2%); no conjunto dos dados de RMN foram observados sinais relacionados a um total de quinze átomos de carbono e dezesseis de hidrogênio.

Em seu espectro de infravermelho foram reconhecidas bandas de absorção em frequências de deformação axial de ligação C—H de aromático ( $\lambda_{\text{máx}}$  3054 cm<sup>-1</sup>), de ligação C—H alifática ( $\lambda_{\text{máx}}$  2974 e 2936 cm<sup>-1</sup>), de ligação C=O de lactona ( $\lambda_{\text{máx}}$  1714 cm<sup>-1</sup>), de ligação C=C de anel aromático ( $\lambda_{\text{máx}}$  1614, 1514, 1448 cm<sup>-1</sup>) e em frequência de deformação axial assimétrica de ligação C—O—C ( $\lambda_{\text{máx}}$  1248 cm<sup>-1</sup>).

O sistema cumarínico substituído nas posições C-6 e C-7 foi inferido após as seguintes observações no espectro de RMN <sup>1</sup>H: um par de dupletos centrados em  $\delta_{\text{H}}$  6.20 ppm (H-3) e 7.86 ppm (H-4) com constante de acoplamento, *J*, em torno de 9.5 Hz que são típicos de hidrogênios de dupla ligação endocíclica com configuração *Z* conjugada a uma função carbonila; e um par de singletos relacionados a dois hidrogênios aromáticos não acoplados em  $\delta_{\text{H}}$  6.94 ppm (H-5) e 7.16 ppm (H-8).

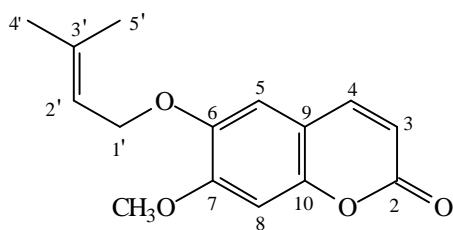
Foram detectados também no espectro de RMN <sup>1</sup>H sinais que confirmaram a existência e o arranjo atômico dos supostos grupamentos substituintes do anel

aromático. O tripleto largo centrado em  $\delta_H$  5.52 ppm (1H,  $J = 6.65$  Hz) indicou a presença de um átomo de hidrogênio olefínico adjacente a um grupo metileno, que por sua vez ocorreu como um duplete centrado em  $\delta_H$  4.69 ppm (2H,  $J = 6.64$ ). O sinal simples em  $\delta_H$  1.79 ppm (6H) sugeriu a presença de duas metilas ligadas a um mesmo carbono do tipo  $sp^2$ . A racionalização deste conjunto de sinais possibilitou a proposição de uma porção prenila ( $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ). Já o singlete em  $\delta_H$  3.85 ppm, com integração para três átomos de hidrogênios, evidenciou o segundo substituinte como um grupo metoxila ( $-\text{OCH}_3$ ).

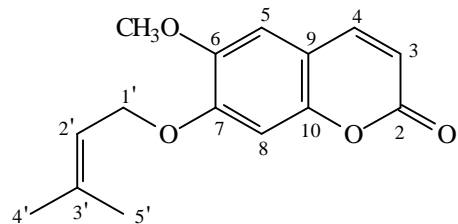
Como citado antes, o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou sinais para quinze átomos de carbono que puderam ser classificados com o auxílio das informações providenciadas pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT como: um carbonílico ( $\delta_C$  161.7 ppm), três carbonos  $sp^2$  oxigenados ( $\delta_C$  152.2, 149.9 e 146.7 ppm), dois  $sp^2$  quaternários ( $\delta_C$  139.1 e 111.3 ppm), cinco  $sp^2$  metínicos ( $\delta_C$  143.4, 118.6, 113.3, 107.9 e 101.1 ppm), um  $sp^3$  oxigenado de grupo metileno ( $\delta_C$  66.3 ppm), um  $sp^3$  oxigenado de grupo metila ( $\delta_C$  56.4 ppm) e dois  $sp^3$  de metilas ( $\delta_C$  25.9 e 18.4 ppm). Como se esperava, essas informações espectroscópicas concordaram com um sistema 2H-1-benzopiran-2-ona e, definitivamente, dioxigenado, visto que são três os carbonos com hibridização  $sp^2$  ligados a oxigênio.

Outras evidências concretas da dioxigenação do anel aromático e que garantiram a função éter com o grupamento prenila ( $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), foram: o reconhecimento do átomo de carbono do grupo metileno como oxigenado; e a localização, agora na ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$ , do sinal relacionado aos hidrogênios metilênicos em  $\delta_H$  4.69 ppm (2H,  $J = 6.64$ ), que se revelou ser influenciado eletronicamente não só por uma dupla ligação adjacente, mas também por um heteroátomo.

A par das unidades que compõem a estrutura molecular de **2** (um núcleo cumarínico 6,7-dioxigenado, uma metoxila e um radical preniloxi) duas estruturas, no caso os isômeros de posição **2a** e **2b**, puderam ser propostas.

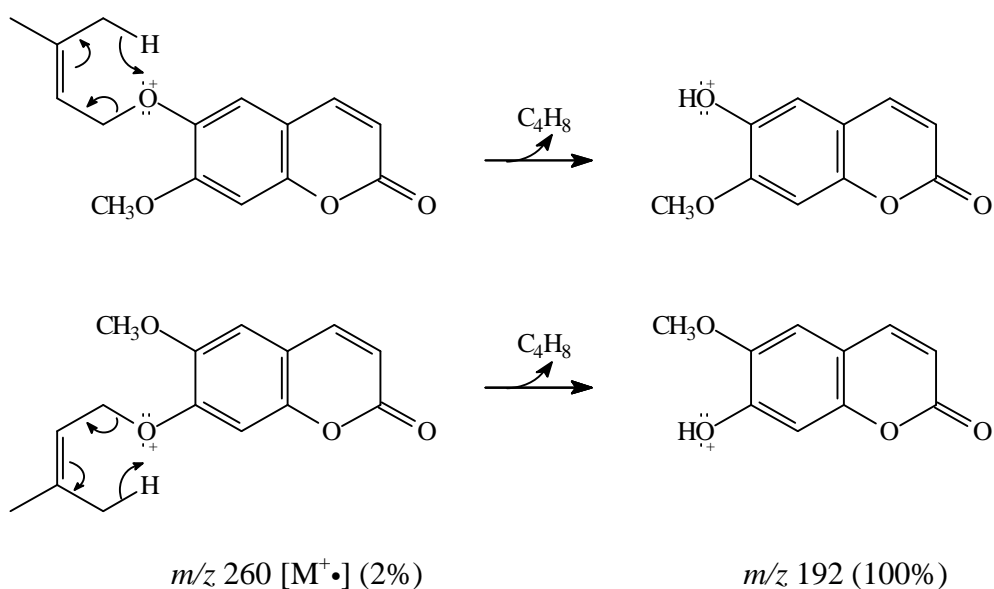


**2a**



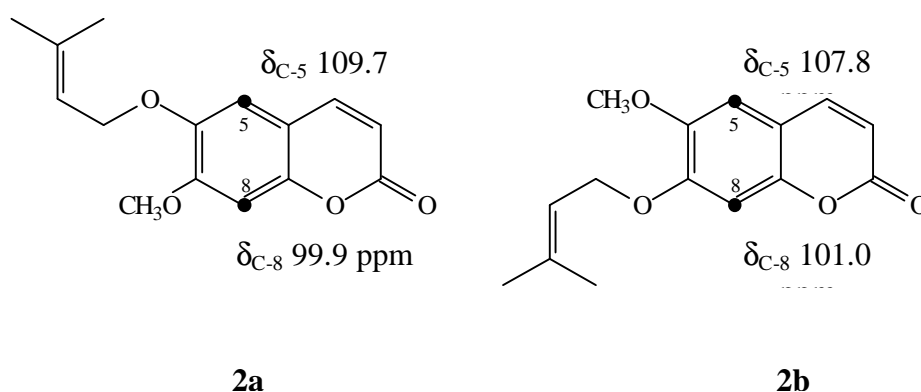
**2b**

Essas propostas estruturais ainda tiveram o respaldo da espectrometria de massas por impacto eletrônico a 70 eV. O principal pico, de  $m/z$  192 u.m.a. (100%), ao invés de ser relacionado à clássica perda de CO pelo heterociclo, é proveniente do rearranjo intramolecular do tipo McLafferty que ocorre na cadeia lateral durante o processo de fragmentação (Esquema II). A etapa subsequente a esta, é a perda de radical metila para dar origem ao fragmento de  $m/z$  177 u.m.a. (33%).



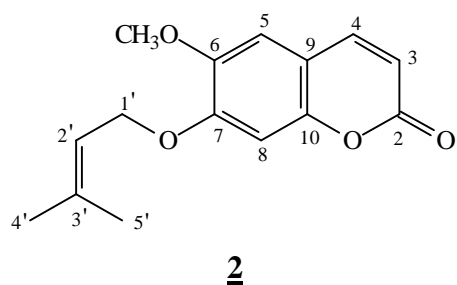
**Esquema II**

Caberia agora encontrar provas para escolher entre as duas possibilidades isoméricas. Cardona e col.<sup>(60)</sup> concluíram que a melhor maneira de diferenciar os isômeros **2a** e **2b** é a análise comparativa dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  registrados em benzeno- $d^6$ , visto que, claramente, percebeu-se diferenças nos deslocamentos químicos dos sinais relacionados à H-5 e H-8 de cada uma das estruturas (**2a**:  $\delta_{\text{H-5}}$  6.37 ppm e  $\delta_{\text{H-8}}$  6.40 ppm; **2b**:  $\delta_{\text{H-5}}$  6.24 ppm e 6.60 ppm), bem como dos sinais para H-1' (**2a**:  $\delta_{\text{H}}$  4.30 ppm; **2b**:  $\delta_{\text{H}}$  4.18 ppm) e para a metoxila (**2a**:  $\delta_{\text{H}}$  3.12 ppm; **2b**:  $\delta_{\text{H}}$  3.35 ppm). Mesmo sem merecer a discussão dos autores na publicação, uma interessante informação exibida no mesmo artigo foi percebida dentre os dados da ressonância magnética de  $^{13}\text{C}$  adquiridos quando a amostra foi solubilizada em clorofórmio- $d$ : o átomo de carbono C-5 de **2b** ( $\delta_{\text{C}}$  107.8 ppm) é 1.9 ppm mais blindado do que C-5 em **2a** ( $\delta_{\text{C}}$  109.7 ppm), enquanto que o carbono C-8 de **2a** ( $\delta_{\text{C}}$  99.9 ppm) é, pois, 1.1 ppm mais blindado do que C-8 de **2b** ( $\delta_{\text{C}}$  101.0 ppm) (Fig. 19). Através das sensíveis diferenças no parâmetro  $\Delta\delta_{\text{C}}$ , que refletem a influência eletrônica dos grupamentos substituintes, a distinção entre as estruturas isoméricas **2a** e **2b** foi absolutamente possível.



**Figura 19.** Variações do deslocamento químico para os átomos C-5 e C-8 de **2a** e **2b**.

Todos os dados discutidos anteriormente corroboraram para que o composto **2** fosse identificado como 7-(3',3'-dimetilaliloxi)-6-metoxicumarina.



### 5.2.3. Três dihidroestiril-lactonas (3-5)

A aplicação de procedimentos convencionais de isolamento a fração solúvel em diclorometano de *P. sabulosa* conduziu ao isolamento de três dihidroestiril-2*H*-piran-2-onas como sólidos amorfos de cor amarela e pontos de fusão 137-140°C (**3**), 148-151°C (**4**), 164-168°C (**5**). Trabalhos anteriores descreveram a identificação de **3** na espécie vegetal *Piper sanctum*<sup>(61)</sup> e de todas elas na própria espécie em estudo<sup>(31)</sup>.

Começamos por descrever a interpretação do conjunto de dados espectrais para determinação estrutural do constituinte químico denominado **3**. Isto porque, com o pré-estabelecimento de uma estrutura base, a progressão do processo de identificação das outras duas substâncias ficará um tanto quanto facilitado. Iniciemos pela dedução de sua fórmula molecular. Em seu espectro de massas o pico representante do íon molecular [ $M^+$ ] apareceu em  $m/z$  274 u.m.a (9%); dos sinais registrados no espectro de RMN  $^{13}C$  foram contabilizados quinze átomos de carbono. Diante desses dados instituiu-se a F.M.  $C_{15}H_{14}O_5$  e em seguida com o número de átomos de carbono e hidrogênio calculou-se um total de nove insaturações para a estrutura.

Partindo para o espectro de RMN  $^1H$ , notou-se, claramente a primeira vista, um padrão de acoplamento típico de um sistema *ABX*, definido pelos sinais centrados em  $\delta_H$  6.73 ppm (1H, *d*,  $J = 7.82$  Hz),  $\delta_H$  6.65 ppm (1H, *sl*) e  $\delta_H$  6.61 ppm (1H, *dl*,  $J = 7.61$  Hz), que caracterizou um anel benzênico do tipo 1,3,4-tri-substituído. Além disso, observou-se um singleto com integração para dois hidrogênios em  $\delta_H$  5.93 ppm que é próprio de grupo metilenodioxí (—OCH<sub>2</sub>O—); tal substituinte tomou seu lugar na estrutura molecular conectando-se as posições C-3 e C-4 do anel aromático, tendo como resultado a estrutura parcial (I). No mesmo tipo de espectro percebeu-se também um par



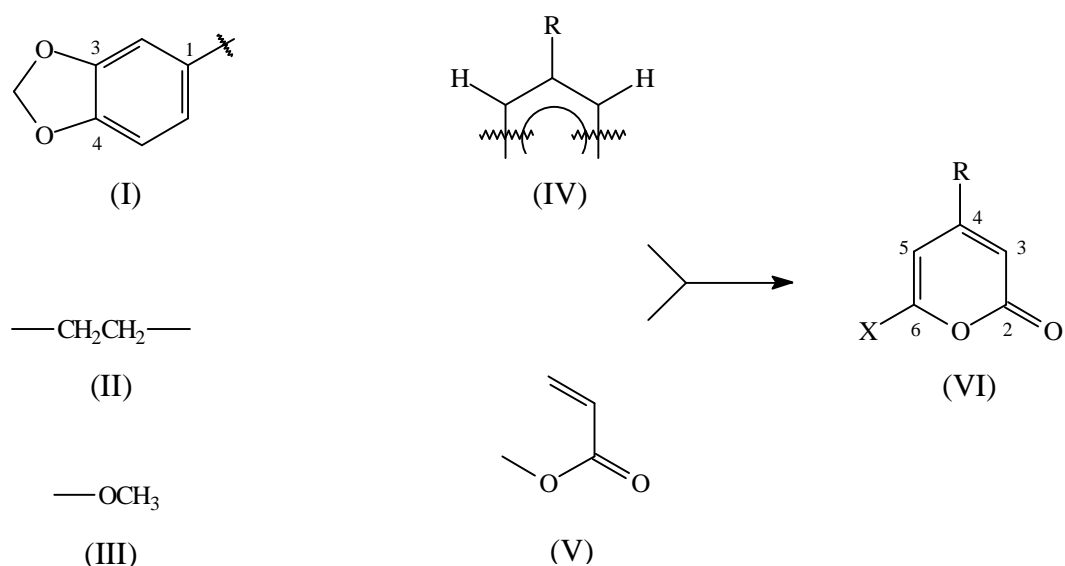
de tripletos com integração para dois átomos de hidrogênio cada e localizados em região de alifáticos, [ $\delta_{\text{H}}$  2.89 ppm ( $t$ ,  $J = 7.89$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  2.69 ppm ( $t$ ,  $J = 7.88$  Hz)], que definiram uma porção da molécula que contém dois grupos metilenos vicinais e isolados ( $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{—}$ ) (II) e um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  3.78 ppm com integração para três hidrogênios, típico de grupo metoxila ( $\text{—OCH}_3$ ) (III) ligado a anéis aromáticos (Fig. 20).

Antes de avançar, contabilizemos os átomos e insaturações já utilizados até aqui para construção da molécula-alvo: um anel benzênico trissubstituído ( $\text{C}_6\text{H}_3$ ) e mais as porções ( $\text{—OCH}_2\text{O—}$ ), ( $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{—}$ ) e ( $\text{—OCH}_3$ ) que ocuparam dez átomos de carbono, doze de hidrogênio, três de oxigênio e cinco insaturações. Logicamente, restamos uma unidade com  $\text{C}_5\text{H}_2\text{O}_2$  e quatro insaturações.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ficou reduzido a um único par de dupletos na região de olefínicos (um centrado em  $\delta_{\text{H}}$  5.72 ppm e outro em  $\delta_{\text{H}}$  5.41 ppm) que possuem integração para um átomo de hidrogênio cada e constante de acoplamento,  $J \approx 2$  Hz, característica de hidrogênios que mantêm relação *meta* entre si. Deste simples conjunto de sinais foi inferida a unidade (IV) mostrada na figura 20.

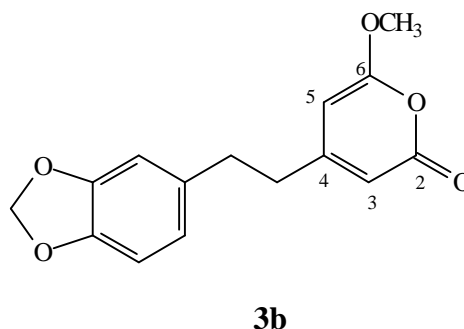
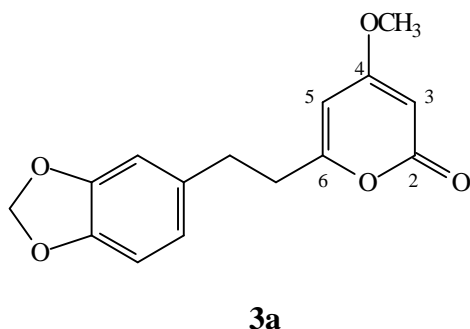
No espectro de infravermelho de 3 a banda mais intensa, aquela em  $\nu_{\text{máx}}$  1710  $\text{cm}^{-1}$ , é de fato um indício decisivo para a construção total de sua estrutura molecular. Segundo informações registradas na literatura<sup>(62)</sup>, absorções nesta faixa de frequência são típicas de estiramento de carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada de  $\delta$ -lactonas, e desta forma, a unidade (V) foi indicada, também, como elemento integrante do arranjo molecular.

A combinação dos componentes (IV) e (V) convergiu para a dedução do sistema heterocíclico 2*H*-piran-2-ona 4,6-disubstituído (VI), que satisfaz exatamente as condições para complemento da fórmula molecular descritas no período final do terceiro parágrafo.

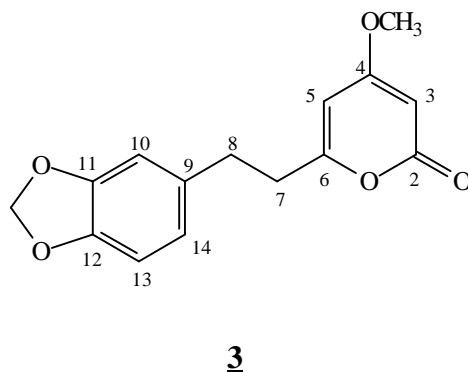


**Figura 20.** Unidades que compõem a estrutura molecular do composto **3**.

Com todas as unidades moleculares em mãos (I-VI), o estabelecimento da conectividade foi a etapa conclusiva da operação de identificação do composto **3**. Analisando-se sobre o prisma do deslocamento químico dos átomos da porção ( $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{—}$ ) observou-se que ambos os pares de hidrogênios equivalentes são menos blindados por cerca de 1.4 ppm em relação aos correspondentes hidrogênios alifáticos que sofrem efeitos eletrônicos menos acentuados. Isto confirmou, em definitivo, que a referida cadeia alifática é um efetivo elemento espaçador de dois grupos elétronsacadores e, imediatamente, foi possível posicioná-la entre os sistemas cíclicos (I) e (VI). Assim sendo, o grupo metoxila (III) foi classificado, indubitavelmente, como o segundo grupamento substituinte da cadeia cíclica heteroatômica. Neste momento duas possibilidades estruturais foram estabelecidas, **3a** e **3b**.



Em princípio, a escolha entre os isômeros só poderia proceder com base em experimentos de NOE, entretanto, neste caso as razões biossintéticas excluem quaisquer alternativas com a natureza molecular de **3b**. Então, prontamente, ao final desta etapa que considerou as análises espectroscópicas de I.V., EMIE e RMN  $^1\text{H}$ , a estrutura do composto **3** pôde ser definida como 4-metoxi-6-(11,12-metilenedioxi-dihidroestiril)-2H-piran-2-ona.



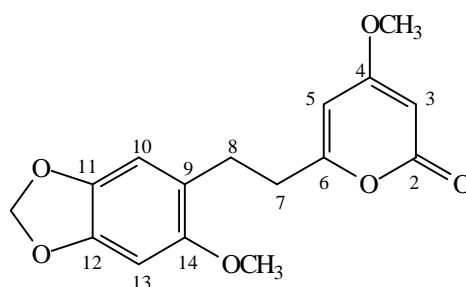
Como já mencionado em linhas anteriores, notou-se sinais para quinze átomos de carbono no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  desacoplado. Com a assistência paralela do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT eles foram devidamente reconhecidos como: um carbonílico ( $\rho_{\text{C}}$  171.2 ppm), quatro  $sp^2$  oxigenados ( $\rho_{\text{C}}$  164.8, 164.2, 147.7 e 146.1 ppm), cinco  $sp^2$  metínicos ( $\rho_{\text{C}}$  121.2, 108.6, 108.3, 100.3 e 87.7 ppm), um  $sp^2$  quaternário ( $\rho_{\text{C}}$  133.6 ppm), um  $sp^3$  metilênico dioxigenado ( $\rho_{\text{C}}$  100.9 ppm), um  $sp^3$  metílico oxigenado ( $\rho_{\text{C}}$  55.8 ppm) e dois  $sp^3$  metilênicos ( $\rho_{\text{C}}$  35.7 e 32.6 ppm). Estas informações corroboram, satisfatoriamente, com a proposta estrutural apresentada para **3**. Posteriormente, com ajuda de valores resgatados da literatura<sup>(31)</sup> realizou-se,

inequivocamente, a atribuição dos sinais de carbono (Tabela 4) e a proposição foi afirmada.

Passemos agora aos compostos seguintes. Os perfis espectrais de **4** e **5** na região do infravermelho foram absolutamente idênticos ao de **3**, fato este que sugeriu uma enorme semelhança estrutural entre as três substâncias. Em ambos os espectros de I.V., a intensa banda de absorção indicativa de deformação axial de ligação C=O foi o destaque (**4**: 1726 cm<sup>-1</sup>; **5**: 1726 cm<sup>-1</sup>).

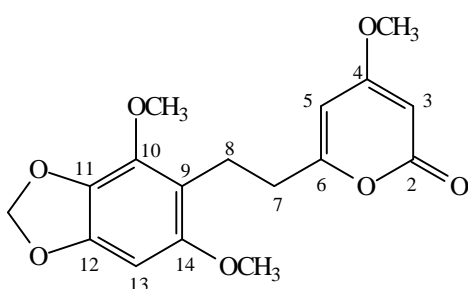
Os modos de fragmentação de **4** e **5** foram similares ao de **3**: poucos fragmentos iônicos e íons moleculares instáveis que sofrem clivagem para resultar em fragmentos de alta estabilidade. Os EMIE de **4** e **5** mostraram os picos correspondentes aos íons moleculares [M]<sup>+</sup> de *m/z* 304 u.m.a. (10%) e *m/z* 334 u.m.a. (4%), respectivamente. Sabendo que isto significou um incremento de 30 u.m.a. e 60 u.m.a. em relação ao valor 274 u.m.a. foi possível deduzir que as estruturas de **4** e **5** nada mais são do que a molécula de **3** acrescida de um e dois grupos —OCH<sub>3</sub>, respectivamente. Tanto é verdadeiro, que quando analisados, os seus espectros de RMN <sup>1</sup>H apresentaram, respectivamente, dois e três sinais representativos para grupos metoxila ligados a aromáticos [**4**: δ<sub>H</sub> 3.78 (3H, *s*) e 3.71 (3H, *s*); **5**: δ<sub>H</sub> 3.96 (3H, *s*), 3.78 (3H, *s*) e 3.71 (3H, *s*)]. Mas, então, onde estão localizados esses substituintes?

Na ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H dos compostos **4** e **5** as absorções dos átomos de hidrogênio pertencentes a cadeia alifática (H-7 e H-8), ao grupamento metilenodioxi (OCH<sub>2</sub>O) e ao sistema heterocíclico substituído (H-3, H-5 e 4-OCH<sub>3</sub>) foram preservadas quando da comparação com os dados espectroscópicos de **3**, conforme é percebido na Tabela 4. A real diferença foi encontrada na região entre δ<sub>H</sub> 6-7 ppm, onde em detrimento aos sinais do sistema de *spin ABX* de **3**, apareceram dois sinais simples em δ<sub>H</sub> 6.59 ppm e 6.50 ppm (integrando para um átomo de hidrogênio cada) no espectro de **4** e um singlete em δ<sub>H</sub> 6.22 ppm (integrando para um hidrogênio) no espectro de **5**. Duas são as conclusões: a) a molécula de **4** é dotada de um anel benzenóide tetra-substituído com dois hidrogênios dispostos em posição *para*, logo ela pôde ser instituída como 4-metoxi-6-(11,12-metilenedioxi-14-metoxi-dihidroestiril)-2H-piran-2-ona pela ligação da metoxila adicional ao carbono C-14 da estrutura de **3**; e

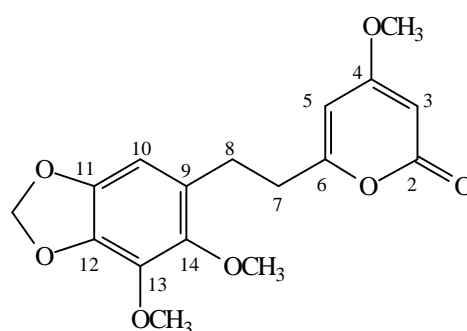


**4**

b) o mesmo sistema cíclico no agregado atômico de **5** é, portanto, penta-substituído; de imediato a incorporação variada dos grupos ( $\text{—OCH}_3$ ) a molécula de **3** gerou duas possibilidades estruturais, os isômeros de posição **5a** (10,14- $\text{OCH}_3$ ) e **5b** (13,14- $\text{OCH}_3$ ).



**5a**



**5b**

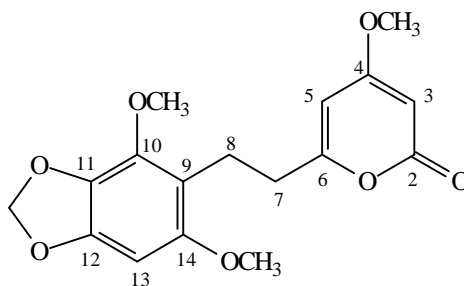
Após a consignação da molécula de **4**, o reconhecimento dos seus dezesseis sinais de carbono-13 foi realizada com apoio do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT [um carbonílico ( $\delta_{\text{C}}$  171.2 ppm), cinco  $sp^2$  oxigenados ( $\delta_{\text{C}}$  165.8, 165.1, 152.3, 146.6 e 140.7 ppm), quatro  $sp^2$  metínicos ( $\delta_{\text{C}}$  109.7, 99.9, 94.5 e 87.5 ppm), um  $sp^2$  quaternário ( $\delta_{\text{C}}$  120.2 ppm), um  $sp^3$  metilênico dioxigenado ( $\delta_{\text{C}}$  100.9 ppm), dois  $sp^3$  metílicos oxigenados ( $\delta_{\text{C}}$  56.2 e 55.7 ppm) e dois  $sp^3$  metilênicos ( $\delta_{\text{C}}$  34.1 e 27.2 ppm)]. Em relação ao espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **3** observou-se, com nitidez, a conversão de um sinal de carbono  $sp^2$  metínico (**3**:  $\delta_{\text{C}}$  121.1 ppm) para um de carbono  $sp^2$  oxigenado (**4**:  $\delta_{\text{C}}$  152.3 ppm) e o aparecimento de um sinal para um carbono  $sp^3$  oxigenado (**4**:  $\delta_{\text{C}}$  56.2 ppm); estes fatos, satisfatoriamente, deram suporte a proposta estrutural apresentada.

Por fim, operou-se a atribuição dos sinais com base nos valores de  $\delta_C$  descritos para **3** (Tabela 4) e confirmou-se a estrutura pela comparação dos dados experimentais com outros encontrados na literatura<sup>(31)</sup>.

De maneira idêntica, a identificação dos dezessete sinais de  $^{13}\text{C}$  registrados para **5** foi feita [um carbonílico ( $\delta_C$  171.2 ppm), seis  $sp^2$  oxigenados ( $\delta_C$  165.8, 165.3, 152.9, 147.7, 141.9 e 130.1 ppm), três  $sp^2$  metínicos ( $\delta_C$  99.6, 88.5 e 87.4 ppm), um  $sp^2$  quaternário ( $\delta_C$  112.0 ppm), um  $sp^3$  metilênico dioxigenado ( $\delta_C$  100.6 ppm), três  $sp^3$  metílicos oxigenados ( $\delta_C$  59.5, 56.3 e 55.7 ppm) e dois  $sp^3$  metilênicos ( $\delta_C$  33.6 e 20.9 ppm)]. Tal espectro concordou com as formas **5a** e **5b** e mostrou, quando comparado ao do composto **3**, duas conversões carbono  $sp^2$  metínico  $\rightarrow$  carbono  $sp^2$  oxigenado [(**3**:  $\delta_C$  121.2 e 108.6 ppm)  $\rightarrow$  (**5**:  $\delta_C$  152.9 e 141.9 ppm)] e o surgimento de dois sinais para carbonos  $sp^3$  oxigenados (**5**:  $\delta_C$  59.5 e 56.2 ppm).

As sensíveis diferenças nos valores de deslocamento químico dos átomos de carbono das três substâncias merece um considerável comentário, visto que, nestes minuciosos detalhes podem estar refugiadas informações providenciais para distinção dos isômeros **5a** e **5b**. O acréscimo do grupo ( $-\text{OCH}_3$ ) à estrutura de **3** para que **4** fosse gerado ocasionou, evidentemente, expressivas mudanças na densidade eletrônica de alguns dos membros que formam o esqueleto carbônico, principalmente no átomo C-8. Tal efeito é devido à influência da eletronegatividade do novo átomo de oxigênio incorporado ao anel citado. Neste momento de análise, reparou-se nos  $\delta_C$  dos átomos de carbono C-7 e C-8 de **3** e **4**. Em ambas as estruturas o caso se repetiu: o átomo C-7 estava localizado em campo mais baixo do que C-8. Extrapolando este modelo para o caso da estrutura ainda não resolvida, foi possível atribuir os sinais em  $\delta_C$  33.6 ppm e  $\delta_C$  20.9 ppm presentes no espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **5** aos átomos de carbono C-7 e C-8, respectivamente. Diante dos três valores de deslocamento químico para C-8, observou-se que na medida em que foram introduzidos os grupamentos metoxila o sinal do átomo mencionado foi conduzido para campos mais altos. Ora, se primeiro este fenômeno eletrônico aconteceu pela ligação de ( $-\text{OCH}_3$ ) em C-14, então a alternativa mais conveniente para preservá-lo foi posicionar o segundo substituinte no átomo de carbono C-10 e por isso preferiu-se **5a** a **5b**. Desta forma, o composto **5** foi identificado como 4-metoxi-6-(11,12-metilenedioxi-10,14-dimetoxi-dihidroestiril)-2H-piran-2-ona. No que tange o descarte do isômero **5b**, postulou-se que o efeito sentido pelo átomo C-8, em razão da própria distância, não teria a mesma magnitude apresentada pela substituição

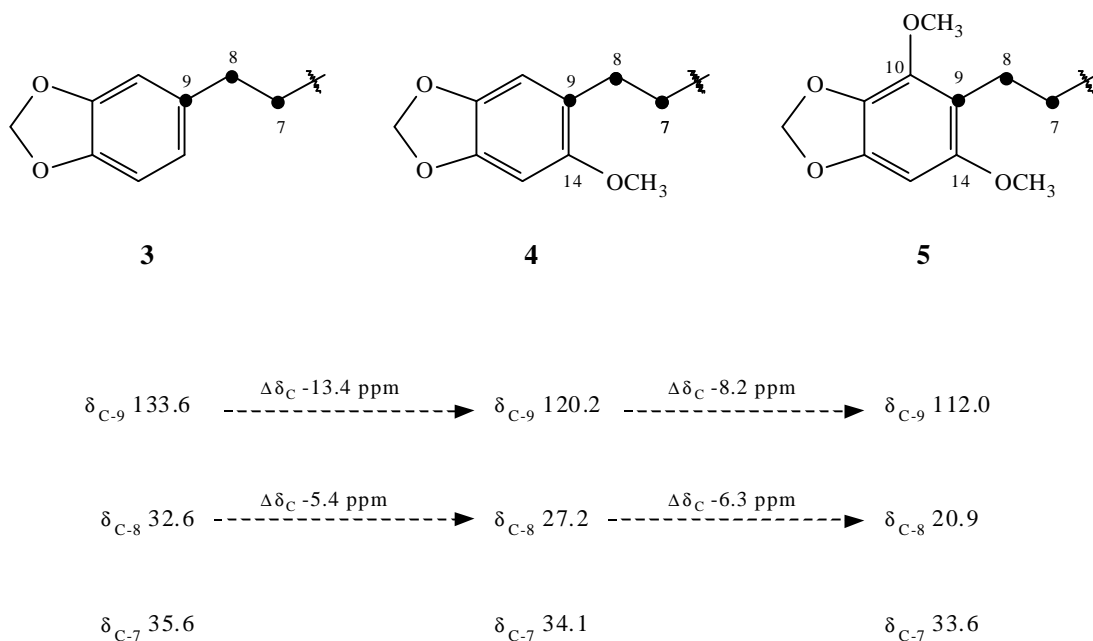
em C-10 e C-14 do que quando em C-13 e C-14, o que torna as duas estruturas isoméricas (**5a** e **5b**) perfeitamente identificáveis. O mesmo tipo de efeito é notado no átomo de carbono C-9. A figura 21 ilustra o trecho descrito.



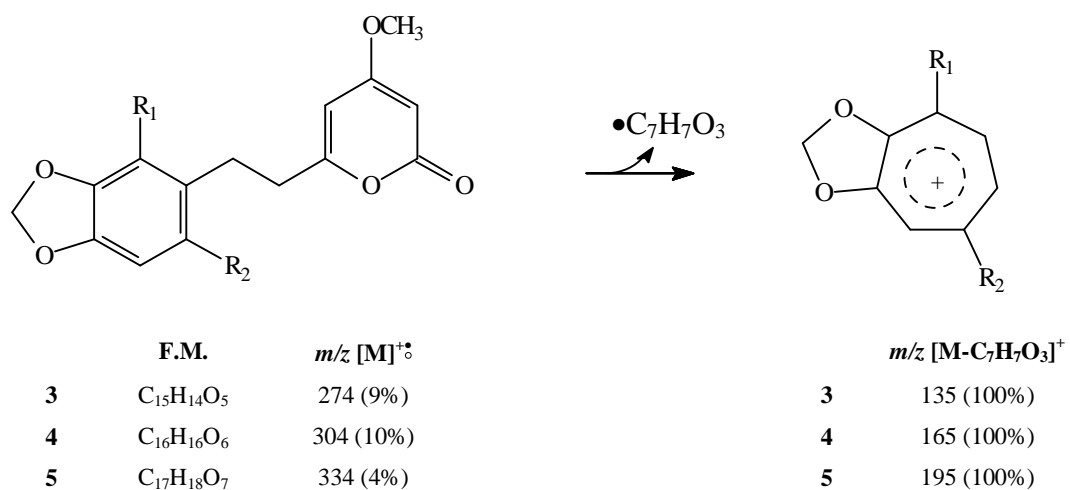
**5**

Em seguida, cumpriu-se o assinalamento dos demais sinais de carbono-13 de **5**, previamente reconhecidos pelo espectro de DEPT, com base nos dados dos dois modelos anteriores (Tabela 4). Neste momento outra evidência que corroborou com a estrutura isomérica escolhida foi o comportamento do deslocamento químico de C-14;  $\delta_{C-14}$  de **5** (152.8 ppm) foi semelhante ao do átomo C-14 de **4** (152.2 ppm) e característico de carbono oxigenado isolado. A presença de uma outra metoxila no carbono adjacente C-13 iria proteger C-14 a ponto de localizá-lo na faixa de 140-145 ppm. Finalmente, a confirmação da estrutura **5** veio, igualmente, da conferência com valores da literatura<sup>(31)</sup>.

Para dar por completa a caracterização de **3**, **4** e **5** relata-se a presença de bandas de absorção relacionadas à distensões axiais de ligações C—H de aromático ( $\nu_{\text{máx}}$  3100-3000  $\text{cm}^{-1}$ ), C—H de alifático ( $\nu_{\text{máx}}$  2950-2900  $\text{cm}^{-1}$ ), C=O  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $\nu_{\text{máx}}$  1726  $\text{cm}^{-1}$  para **4** e **5**), C=C de anel aromático ( $\nu_{\text{máx}}$  1650-1450  $\text{cm}^{-1}$ ) e deformação axial assimétrica de C—O—C ( $\nu_{\text{máx}}$  1240-1260  $\text{cm}^{-1}$ ) na espectroscopia de infravermelho. Com respeito aos espectros de massas, obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, o pico de fragmentação mais importante em todos (**3**:  $m/z$  135 u.m.a., **4**:  $m/z$  165 u.m.a. e **5**:  $m/z$  195 u.m.a.) foi atribuído ao íon tropílio proveniente da clivagem da ligação C—C entre os dois grupos metilenos que constituem a cadeia alifática (Esquema III).



**Figura 21.** Variações do deslocamento químico para os átomos C-8 e C-9 de **3**, **4** e **5**.



### Esquema III



**Tabela 4.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) e RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) dos compostos **3-5**. Deslocamentos químicos,  $\delta$ , em ppm e constantes de acoplamento,  $J$  (entre parênteses), em Hz.

C	3 ( $\text{CDCl}_3$ )		4 ( $\text{CDCl}_3$ )		5 ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>2</b>	-	171.2	-	171.2	-	171.2
<b>3</b>	5.41 ( <i>d</i> , 2.03)	87.7	5.40 ( <i>d</i> , 2.18)	87.5	5.40 ( <i>d</i> , 2.13)	87.5
<b>4</b>	-	164.8	-	165.8	-	165.8
<b>5</b>	5.72 ( <i>d</i> , 2.02)	100.3	5.71 ( <i>d</i> , 2.15)	99.9	5.72 ( <i>d</i> , 2.21)	99.5
<b>6</b>	-	164.2	-	165.1	-	165.3
<b>7</b>	2.69 ( <i>t</i> , 7.88)	35.6	2.66 ( <i>t</i> , 7.78)	34.1	2.69 ( <i>t</i> , 7.31); 2.57 ( <i>t</i> , 7.30)*	33.6
<b>8</b>	2.89 ( <i>t</i> , 7.89)	32.6	2.86 ( <i>t</i> , 7.63)	27.2	2.88 ( <i>dd</i> , 7.80)	20.9
<b>9</b>	-	133.6	-	120.2	-	112.0
<b>10</b>	6.65 ( <i>sl</i> )	108.6	6.59 ( <i>s</i> )	109.7	-	141.9
<b>11</b>	-	147.7	-	140.7	-	130.1
<b>12</b>	-	146.1	-	146.6	-	147.7
<b>13</b>	6.73 ( <i>d</i> , 7.82)	108.3	6.50 ( <i>s</i> )	94.5	6.22 ( <i>s</i> )	88.5
<b>14</b>	6.61 ( <i>dl</i> , 7.61)	121.1	-	152.2	-	152.8
<b>4-OCH<sub>3</sub></b>	3.78 ( <i>s</i> )	55.8	3.78 ( <i>s</i> )	55.7	3.78 ( <i>s</i> )	55.7
<b>10-OCH<sub>3</sub></b>		-	-	-	3.96 ( <i>s</i> )	59.5
<b>14-OCH<sub>3</sub></b>		-	3.70 ( <i>s</i> )	56.2	3.71 ( <i>s</i> )	56.2
<b>OCH<sub>2</sub>O</b>	5.93 ( <i>s</i> )	100.9	5.88 ( <i>s</i> )	100.9	5.85 ( <i>s</i> )	100.6

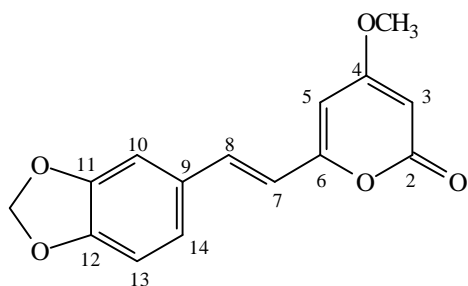
\* Os hidrogênios deste grupo  $\text{CH}_2$  não são equivalentes.

#### 5.1.4. Três estiril-lactonas (6, 7 e 9)

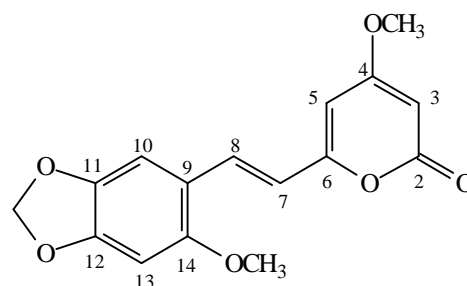
Juntamente com as  $\alpha$ -pironas **3-5**, foram obtidas da fração solúvel em diclorometano de *P. sabulosa* (Polygalaceae) três conhecidas estiril-2*H*-piran-2-onas na forma de sólidos amorfos de cor amarela e pontos de fusão 198-201°C (**6**), 186-189°C (**7**) e 147-149°C (**9**)<sup>(31,63)</sup>.

Indiferentemente, os espectros de I.V. das substâncias **6**, **7** e **9** apresentaram perfis característicos das dihidroestiril-pironas **3-5**; em todos eles foram registradas, dentre outras, bandas de absorção relacionadas à deformações axiais de ligações C—H de aromático ( $\nu_{\text{máx}}$  3100-3050  $\text{cm}^{-1}$ ), C—H de alifático ( $\nu_{\text{máx}}$  2950-2900  $\text{cm}^{-1}$ ), C=O de lactona ( $\nu_{\text{máx}}$  1750-1700  $\text{cm}^{-1}$ ), C=C de anel aromático ( $\nu_{\text{máx}}$  1600-1585  $\text{cm}^{-1}$ ) e à deformação axial assimétrica de C—O—C ( $\nu_{\text{máx}}$  1250-1260  $\text{cm}^{-1}$ ). Devido a grande similaridade entre as propriedades moleculares na região do infravermelho, pressupôs-se, de imediato, que os arranjos atômicos de **6**, **7** e **9** seriam semelhantes às estruturas dos compostos **3-5**.

Rapidamente, os compostos **6** e **7** foram identificados como 4-metoxi-6-(11,12-metilenedioxi-estiril)-2*H*-piran-2-ona e 4-metoxi-6-(11,12-metilenedioxi-14-metoxi-estiril)-2*H*-piran-2-ona, respectivamente. Estas deduções foram baseadas na análise comparativa dos dados espectroscópicos de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das amostras em questão com aqueles descritos para os compostos **3** e **4** (Tabela 5).



**6**



**7**

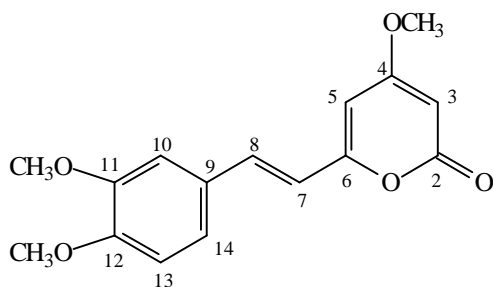
Na RMN  $^1\text{H}$ , ao invés do par de tripletos na região de alifáticos descritos para os modelos, foram observados nos espectros de **6** e **7** um par de dupletos entre  $\delta_{\text{H}}$  6-8 ppm com alta constante de acoplamento que caracterizaram a presença de dois hidrogênios olefínicos de dupla ligação com configuração *trans* [para **6** centrados em  $\delta_{\text{H}}$  7.19 ppm (1H,  $J = 15.97$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6.65 ppm (1H,  $J = 16.06$  Hz); para **7** centrados em  $\delta_{\text{H}}$  7.76 ppm (1H,  $J = 16.21$  Hz) e 6.45 ppm (1H,  $J = 16.10$  Hz)]. O restante dos sinais de hidrogênios de **6** e **7** tiveram as suas localizações e feições conservados em relação aos sinais dos compostos **3** e **4**, respectivamente.

Com as associações dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  desacoplados e RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT de **6** e **7** foram identificados e reconhecidos sinais relacionados a quinze átomos de carbono para o primeiro composto e dezesseis para o segundo [**6**: um carbonílico ( $\delta_{\text{C}}$  171.2 ppm), quatro  $sp^2$  oxigenados ( $\delta_{\text{C}}$  161.2, 159.0, 148.7 e 148.4 ppm), sete  $sp^2$  metínicos ( $\delta_{\text{C}}$  135.5, 116.8, 108.7, 105.9, 123.5, 100.7 e 88.5 ppm), um  $sp^2$  quaternário ( $\delta_{\text{C}}$  129.7 ppm), um  $sp^3$  metilênico dioxigenado ( $\delta_{\text{C}}$  101.5 ppm) e um  $sp^3$  metílico oxigenado ( $\delta_{\text{C}}$  55.9 ppm); **7**: um carbonílico ( $\delta_{\text{C}}$  171.3 ppm), cinco  $sp^2$  oxigenados ( $\delta_{\text{C}}$  164.4, 159.6, 154.4, 149.8 e 141.6 ppm), seis  $sp^2$  metínicos ( $\delta_{\text{C}}$  130.7, 116.6, 105.8, 94.5, 100.2 e 88.1 ppm), um  $sp^2$  quaternário ( $\delta_{\text{C}}$  116.8 ppm), um  $sp^3$  metilênico dioxigenado ( $\delta_{\text{C}}$  101.6 ppm) e dois  $sp^3$  metílico oxigenado ( $\delta_{\text{C}}$  56.3 e 55.8 ppm)]. As únicas diferenças encontradas em ambos os casos com relação aos devidos modelos foi o aparecimento de sinais para dois carbonos  $sp^2$  metínicos (**6**:  $\delta_{\text{C}}$  135.5 e 116.8 ppm; **7**:  $\delta_{\text{C}}$  130.7 e 116.6 ppm) em detrimento aos sinais de dois carbonos  $sp^3$  alifáticos (**3**:  $\delta_{\text{C}}$  35.6 e 32.6 ppm; **4**:  $\delta_{\text{C}}$  34.1 e 27.2 ppm), confirmando que **6** e **7** são realmente homólogos insaturados de **3** e **4**, respectivamente.

Raciocínio idêntico, agora com relação aos sinais espectrométricos da estrutura de **6**, foi desenvolvido para identificação do composto **9**. Os sinais e os padrões de acoplamento dos hidrogênios que compõem o anel benzênico, a dupla ligação e o sistema heterociclo foram preservados quando se realizou a comparação dos espectros RMN  $^1\text{H}$  de **6** e **9**. A diferença fundamental foi a extinção do singlete em  $\delta_{\text{H}}$  5.93 ppm (2H) do espectro do composto **6** para dar lugar ao aparecimento de dois sinais simples na região entre  $\delta_{\text{H}}$  3.60 a 4.00 ppm presentes no espectro de **9**. Isto deu a entender que a

estrutura molecular de **9** era dotada, não mais de um grupo metilenodioxi, mas sim, de dois substituintes ( $\text{—OCH}_3$ ) posicionados, evidentemente, um no átomo de carbono C-11 e outro em C-12.

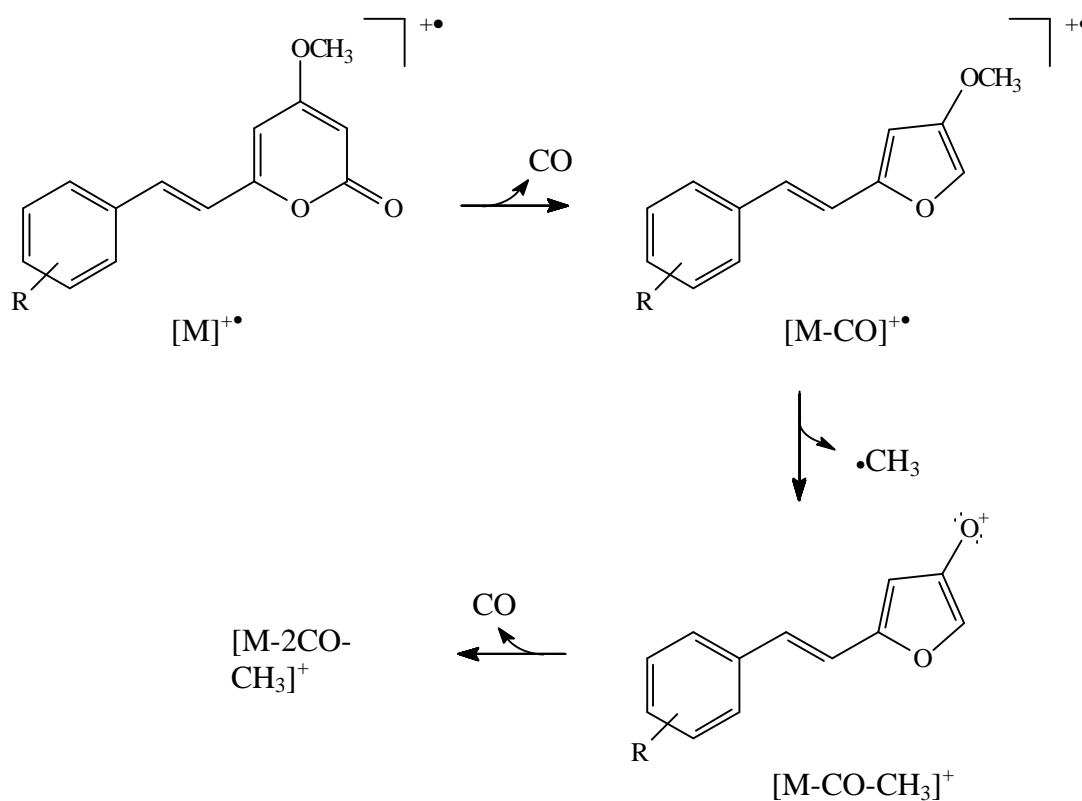
A ressonância magnética nuclear de carbono-13 de **9** (espectros desacoplado e DEPT) mostrou sinais para as seguintes espécies de carbono: um carbonílico ( $\delta_{\text{C}}$  171.2 ppm), quatro  $sp^2$  oxigenados ( $\delta_{\text{C}}$  164.2, 159.0, 150.3 e 149.0 ppm), sete  $sp^2$  metínicos ( $\delta_{\text{C}}$  135.5, 121.5, 116.6, 111.1, 109.2, 100.5 e 88.2 ppm), um  $sp^2$  quaternário ( $\delta_{\text{C}}$  128.2 ppm) e três  $sp^3$  metílicos oxigenados ( $\delta_{\text{C}}$  56.0, 55.9 e 55.8 ppm). A hipótese de troca do substituinte cíclico de **6** por duas metoxilas foi, igualmente, sustentada pelos valores de  $\delta_{\text{C}}$ . Dentre eles, o sinal para um átomo de carbono  $sp^3$  metilênico dioxigenado (**6**:  $\delta_{\text{C}}$  101.5 ppm) não estava presente, porém, mais dois carbonos  $sp^3$  metílicos oxigenados haviam sido registrados (**9**:  $\delta_{\text{C}}$  56.0 e 55.9 ppm). Assim, o composto **9** foi definido como 4-metoxi-6-(11,12-dimetoxi-estiril)-2H-piran-2-ona.



**9**

O êxito de todo este processo de elucidação foi alcançado quando os espectros de massas de **6**, **7** e **9** apresentaram os picos relacionados aos íons moleculares em  $m/z$  272 u.m.a. (100%) (**6**),  $m/z$  302 u.m.a. (100%) (**7**) e  $m/z$  288 u.m.a. (100%) (**9**). Eles concordaram, satisfatoriamente, com as estruturas inferidas pois expressaram a verdade sobre as fórmulas moleculares de cada um dos compostos (**6**:  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ; **7**:  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$ ; **9**:  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$ ). Uma análise avançada dos EMIE revelou um interessante fato: a simples introdução de uma insaturação na cadeia espaçadora contida nas moléculas das dihidroestiril-pironas conferiu aos derivados insaturados (**6**, **7** e **9**) um modelo de fragmentação particular ao heterociclo 2H-piran-2-ona, onde o íon molecular apresenta-

se altamente estável e a primeira etapa de sua degradação é a expulsão de CO com conseqüente contração do sistema heteroatômico para dar origem ao fragmento contendo o anel furano. Na seqüência, este fragmento iônico perde consecutivamente a espécie radicalar metil ( $\bullet\text{CH}_3$ ) e novamente CO (Esquema IV).



	FM	$[M]^{+\bullet}$	$[M-\text{CO}]^{+\bullet}$	$[M-\text{CO}-\text{CH}_3]^+$	$[M-2\text{CO}-\text{CH}_3]^+$
<b>6</b>	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	272 (100%)	244 (28%)	229 (19%)	201 (87%)
<b>7</b>	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$	302 (100%)	274 (13%)	259 (15%)	231 (29%)
<b>8</b>	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$	332 (100%)	304 (16%)	289 (11%)	261 (21%)
<b>9</b>	$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$	288 (100%)	260 (28%)	245 (25%)	217 (56%)

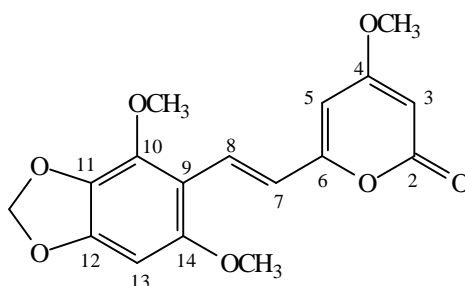
**Esquema IV**

Na Tabela 5 encontra-se resumido o assinalamento dos sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  que foi alcançado pela comparação dos  $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$  das amostras com valores apresentados na literatura<sup>(31, 71)</sup>.

### 5.1.5. Uma nova estiril-lactona (**8**)

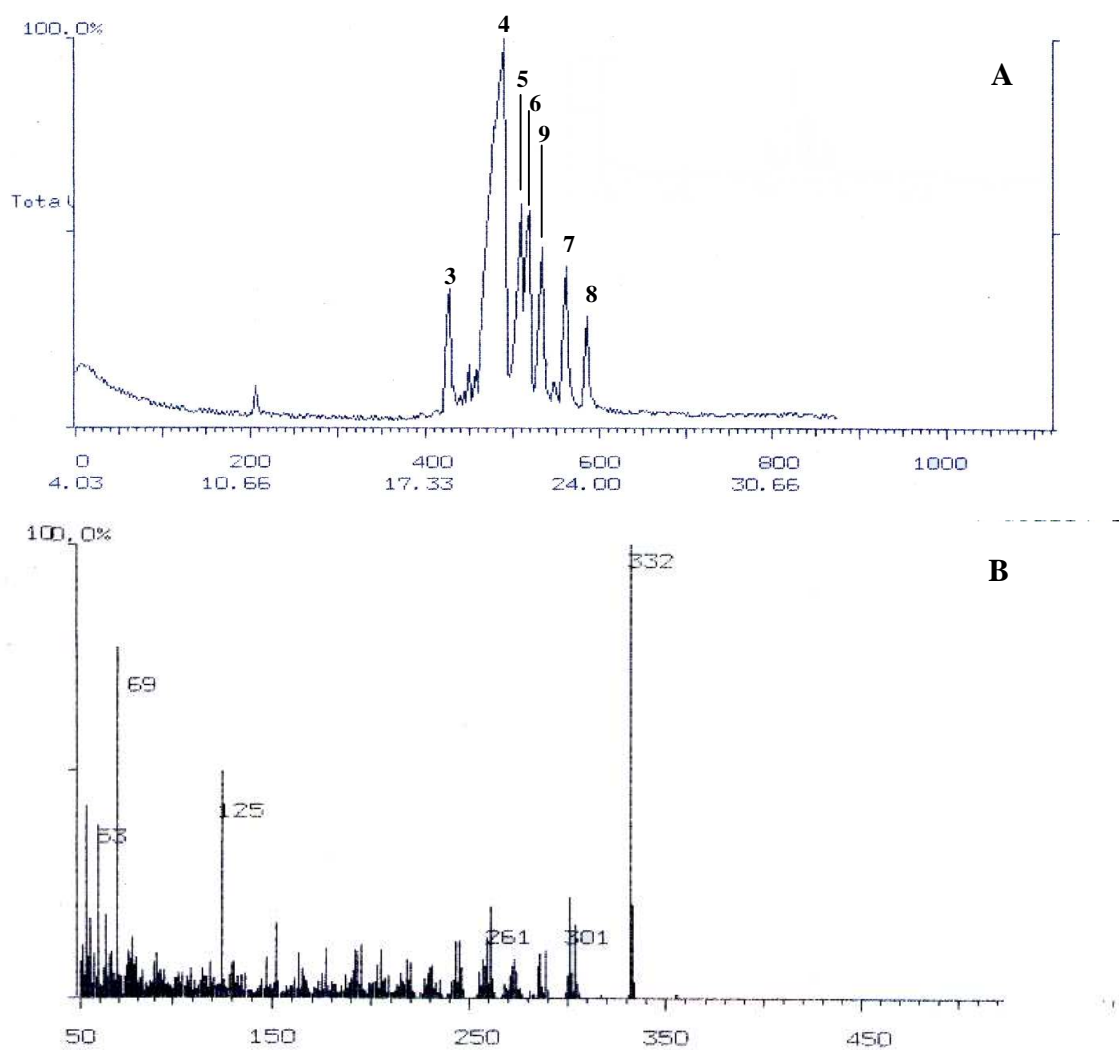
Em adicional com as demais substâncias isoladas da fração solúvel em diclorometano, uma nova estiril-lactona (**8**) foi identificada como constituinte minoritário, ocorrendo em mistura com o composto **7**. É interessante ressaltar que os maiores estímulos e evidências na busca desta atraente estrutura — por ser inédita em fontes biológicas — foram as acentuadas razões biossintéticas e as evidências fornecidas por uma análise preliminar por CGAR-EM.

Inicialmente, o combinado das frs. 80-97 (*vide* seção 4.1.8, pág. 52) foi submetida a análise por CGAR-EM (Figura 22-A). O pico com  $T_r$  igual a 23.63 minutos apresentou espectro de massas que rapidamente caracterizou o composto **8** como 4-metoxi-6-(11,12-metilenedioxi-10,14-metoxi-estiril)-2*H*-piran-2-ona. O respectivo EMIE (Fig. 22-B) evidenciou um modo de fragmentação idêntico ao modelo apresentado no Esquema IV (pág. 86), tendo íon molecular bastante estável [ $m/z$  332 u.m.a. (100%); FM:  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$ ] que sofre perdas sucessivas de CO,  $\text{CH}_3$  radicalar e, novamente, CO para dar origem aos fragmentos iônicos de  $m/z$  304 (16%),  $m/z$  289 (11%),  $m/z$  261 (21%), respectivamente.



**8**

Os demais picos do cromatograma foram relacionados de acordo com os espectros de massas com os seguintes compostos: **3** ( $T_r = 18.26$  min.); **4** ( $T_r = 19.00$  min.); **5** ( $T_r = 21.00$  min.); **6** ( $T_r = 21.33$  min.); **7** ( $T_r = 22.76$  min.); **9** ( $T_r = 21.83$  min.).



**Figura 22.** A) Cromatograma do combinado das frs. 80-97 obtido por CGAR;  
B) EMIE relacionado ao pico com  $T_r$  igual a 23.63 minutos.

Após proceder com a separação cromatográfica do combinado das frs. 80-97, isolou-se da 13ª subfração um sólido amorfo amarelo que de acordo com a análise preliminar por CCD tratava-se de uma mistura de dois compostos.

A espectrometria de infravermelho não deixou qualquer dúvida sobre a natureza molecular dos constituintes da mistura: novamente tratava-se de estruturas semelhantes à das dihidroestiril- ou estiril-pironas descritas anteriormente, já que o perfil espectral nesta região era idêntico aos dos respectivos compostos. As principais bandas de absorção foram relacionadas, igualmente, à deformações axiais de ligações C—H de aromático ( $\nu_{\text{máx}}$  3080  $\text{cm}^{-1}$ ), C—H de alifático ( $\nu_{\text{máx}}$  2920 e 2848  $\text{cm}^{-1}$ ), C=O  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $\nu_{\text{máx}}$  1724  $\text{cm}^{-1}$ ), C=C de anel aromático ( $\nu_{\text{máx}}$  1634, 1560 e 1482  $\text{cm}^{-1}$ ) e à deformação axial assimétrica de C—O—C ( $\nu_{\text{máx}}$  1254  $\text{cm}^{-1}$ ).

No espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  da mistura estavam nítidos os sinais do composto **7**, entretanto, foram notados também sinais adicionais (Tabela 5). Atentando-se para os detalhes (integração e deslocamento químico) percebeu-se que estes sinais [um par de dupletos centrados em  $\delta_{\text{H}}$  7.74 ppm ( $J = 16.21$  Hz) e 6.45 ppm ( $J = 16.10$  Hz) que caracterizaram uma ligação dupla *trans* dissubstituída; um par de dupletos centrados em  $\delta_{\text{H}}$  5.88 ppm ( $J = 2.13$  Hz) e 5.45 ppm ( $J = 2.32$  Hz) atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-5 do anel piranolactona; um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6.27 ppm atribuído ao átomo de hidrogênio aromático isolado; um singlete representando o grupo dioximetileno em  $\delta_{\text{H}}$  5.91 ppm; e três singletos, em 4.05, 3.83 e 3.81 ppm, representantes dos três grupos metóxi] estão em perfeita harmonia com uma estrutura semelhante a **7**, porém, não mais com dois átomos de hidrogênios isolados no anel benzênico, mas apenas um com deslocamento químico semelhante ao do átomo de hidrogênio H-13 da estrutura **5** [**8**:  $\delta_{\text{H}}$  6.27 (s); **5**:  $\delta_{\text{H}}$  6.22 (s)]. Estes dados suportaram a proposta estrutural apresentada para o composto **8**, que neste texto é descrito como uma nova estiril-lactona da fração solúvel em diclorometano de *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). Embora a posição do hidrogênio aromático isolado não fique devidamente estabelecida somente pela análise espectral de RMN  $^1\text{H}$ , sugerimos a estrutura **8** em função das acentuadas razões biogenéticas que favorecem a co-ocorrência de dihidroestiril-pironas (**3**, **4** e **5**) e as correspondentes estiril-pironas (**6**, **7** e **8**).



Depois de excluir os sinais do composto **7**, os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  desacoplado e RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  apresentam dados que permitiram definir a seguinte composição: um carbono carbonílico ( $\delta_{\text{C}}$  171.2 ppm), seis carbonos  $sp^2$  oxigenados ( $\delta_{\text{C}}$  164.6, 160.7, 155.5, 150.2, 142.8 e 135.5 ppm), cinco carbonos  $sp^2$  metínicos ( $\delta_{\text{C}}$  127.2, 119.8, 99.9, 88.7 e 87.8 ppm), um  $sp^2$  quaternário ( $\delta_{\text{C}}$  109.7 ppm), um  $sp^3$  metilênico dioxigenado ( $\delta_{\text{C}}$  101.1 ppm) e três  $sp^3$  metílicos oxigenados ( $\delta_{\text{C}}$  59.7, 56.3 e 55.8 ppm) (Tabela 5). Todos os tipos de átomos de carbono registrados são perfeitamente ajustáveis a estrutura **8**. Novamente os mesmos comportamentos prognosticáveis nas frequências de absorção dos átomos de carbono C-9 (**6**:  $\delta_{\text{C}}$  129.7 ppm; **7**:  $\delta_{\text{C}}$  116.8 ppm; **8**:  $\delta_{\text{C}}$  109.7 ppm) e C-14 (**6**:  $\delta_{\text{C}}$  123.5 ppm; **7**:  $\delta_{\text{C}}$  154.4 ppm; **8**:  $\delta_{\text{C}}$  155.5 ppm) foram decisivos para localizar o terceiro grupo metoxila no átomo C-10 e, assim, confirmar a proposição inferida.

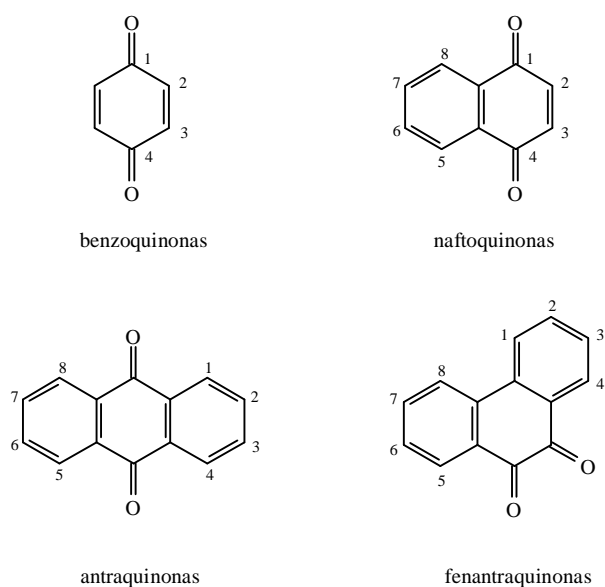
**Tabela 5.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) e RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) dos compostos **6-9**.  
Deslocamentos químicos,  $\delta$ , em ppm e constantes de acoplamento,  $J$   
(entre parênteses), em Hz.

C	6*		7 (CDCl <sub>3</sub> )		8 (CDCl <sub>3</sub> )		9 (CDCl <sub>3</sub> )	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>2</b>	-	171.2	-	171.3	-	171.4	-	171.2
<b>3</b>	5.38 ( <i>d</i> , 1.85)	88.5	5.45 ( <i>d</i> , 2.32)	88.1	5.45 ( <i>d</i> , 2.32)	87.8	5.48 ( <i>d</i> , 2.00)	88.2
<b>4</b>	-	161.2	-	164.4	-	164.6	-	164.2
<b>5</b>	5.97 ( <i>d</i> , 1.83)	100.7	5.88 ( <i>d</i> , 2.13)	100.2	5.88 ( <i>d</i> , 2.12)	99.9	5.92 ( <i>d</i> , 2.01)	100.5
<b>6</b>	-	159.0	-	159.6	-	160.7	-	159.0
<b>7</b>	6.65 ( <i>d</i> , 16.06)	116.8	6.45 ( <i>d</i> , 16.02)	116.6	6.45 ( <i>d</i> , 16.10)	119.8	6.45 ( <i>d</i> , 15.88)	116.6
<b>8</b>	7.19 ( <i>d</i> , 15.97)	135.5	7.76 ( <i>d</i> , 16.01)	130.7	7.74 ( <i>d</i> , 16.21)	127.2	7.44 ( <i>d</i> , 15.89)	135.5
<b>9</b>	-	129.7	-	116.8	-	109.7	-	128.2
<b>10</b>	7.10 ( <i>sl</i> )	108.7	7.06 ( <i>s</i> )	105.8	-	142.8	7.02 ( <i>d</i> , 1.61)	109.2
<b>11</b>	-	148.9	-	141.6	-	135.5	-	149.0
<b>12</b>	-	148.4	-	149.8	-	150.2	-	150.3
<b>13</b>	6.76 ( <i>d</i> , 8.02)	105.9	6.53 ( <i>s</i> )	94.5	6.27 ( <i>s</i> )	88.7	6.87 ( <i>d</i> , 8.26)	111.1
<b>14</b>	7.02 ( <i>dl</i> , 8.01)	123.5	-	154.4	-	155.5	7.08 ( <i>dd</i> , 1.84, 8.34)	121.5
<b>4-OCH<sub>3</sub></b>	3.76 ( <i>s</i> )	55.9	3.82 ( <i>s</i> )	55.8	3.83 ( <i>s</i> )	55.8	3.93 ( <i>s</i> )	55.8
<b>10-OCH<sub>3</sub></b>	-	-	-	-	4.05 ( <i>s</i> )	59.7	-	-
<b>14-OCH<sub>3</sub></b>	-	-	3.83 ( <i>s</i> )	56.3	3.81 ( <i>s</i> )	56.3	-	-
<b>OCH<sub>2</sub>O</b>	5.93 (2H, <i>s</i> )	101.5	5.95 ( <i>s</i> )	101.6	5.91 ( <i>s</i> )	101.1	-	-
<b>11-OCH<sub>3</sub></b>	-	-	-	-	-	-	3.91 ( <i>s</i> )	56.0
<b>12-OCH<sub>3</sub></b>	-	-	-	-	-	-	3.82 ( <i>s</i> )	55.9

\* RMN  $^1\text{H}$  em acetona- $d_6$  e RMN  $^{13}\text{C}$  em CDCl<sub>3</sub>.

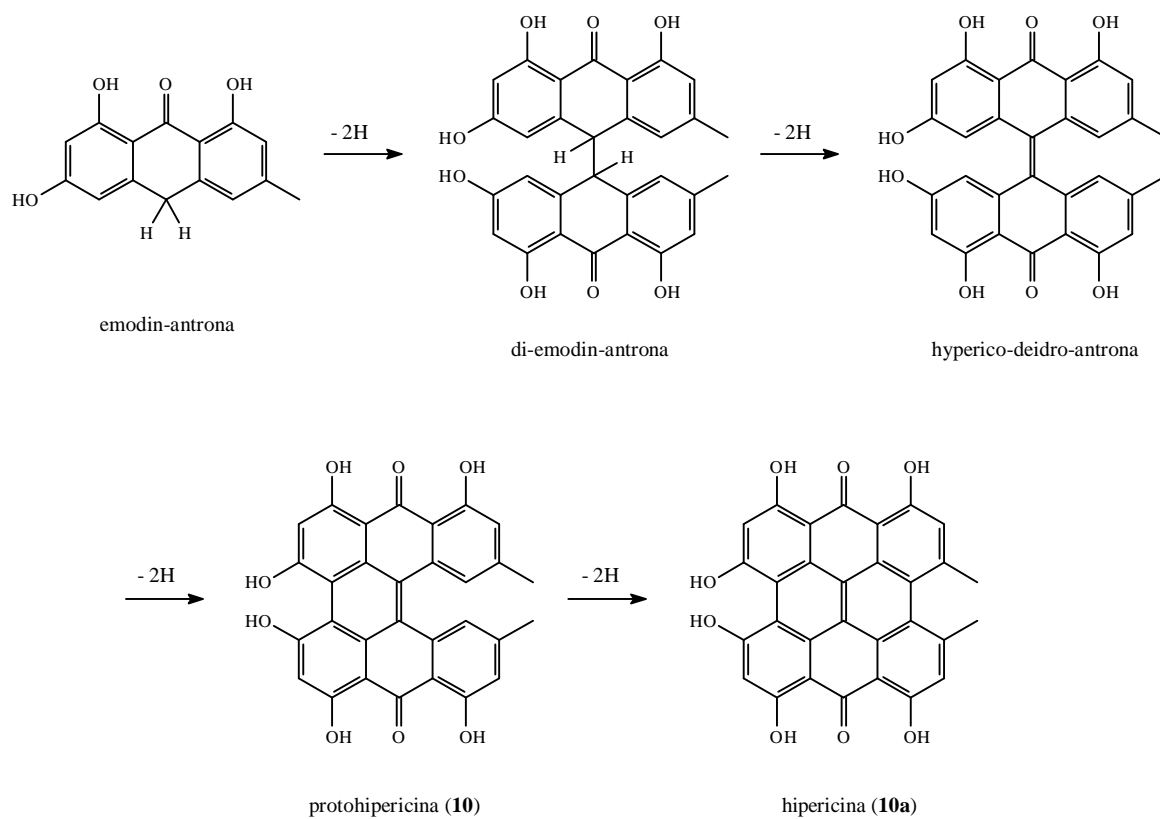
### 5.1.6. Protohipericina (10)

As quinonas são um conjunto de pigmentos encontrados em muitas fontes biológicas (em plantas superiores, fungos e menos freqüentemente em algas, bactérias e em indivíduos do Reino Animal). Elas derivam da oxidação de compostos fenólicos produzidos pela rota do acetato-malonato e, algumas vezes, da rota do shiquimato. De acordo com os seus núcleos estruturais básicos, que se caracterizam pela presença de um certo tipo especial de dicetona  $\alpha,\beta$ -insaturada, elas podem ser classificadas como benzoquinonas (I), naftoquinonas (II), antraquinonas (III) e fenantraquinonas (IV). Supõem-se que muitas delas tomam parte nos ciclos de oxidação-redução essenciais aos organismos vivos.



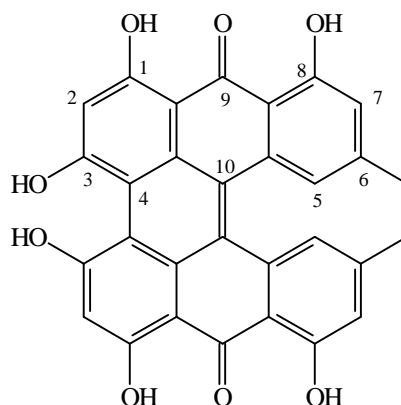
**Figura 23.** Classificação das quinonas.

A bis-antraquinona protohipericina (**10**) foi novamente isolada de *P. sabulosa* (Polygalaceae)<sup>(31)</sup> como um sólido cristalino vermelho. A sua presença foi reportada, p.e., em algumas espécies vegetais do gênero *Hypericum* (Guttiferae)<sup>(10)</sup>. Biogeneticamente, esta dicetona policíclica condensada é considerada o precursor do hypericin (**10a**), um potente agente antiviral<sup>(10,11)</sup>. Na Figura 24 são ilustradas as etapas de formação natural do protohipericina e hipericina em espécies do gênero *Hypericum*<sup>(19)</sup>.



**Figura 24.** Expressão da gênese do protohipericina (**10**) e da hipericina (**10a**).

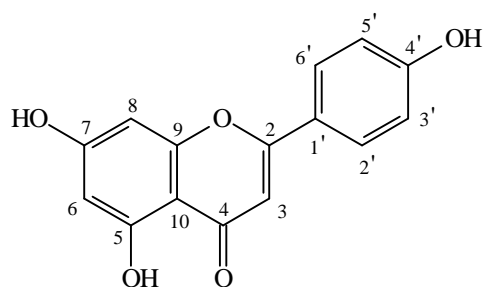
Por uma simples verificação por cromatografia em camada delgada utilizando padrão autêntico e três sistemas de eluentes [Hexano/AcOEt (4:1), Tolueno/AcOEt (4:1) e  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (4:1)] o composto **10** foi identificado como protohipericina [ $R_f$ : 0,66; eluente: Tolueno/AcOEt (4:1)]. A espectrometria no infravermelho confirmou a presença dos grupos hidroxila ( $\nu_{\text{O-H}}$   $3466\text{ cm}^{-1}$ ) e das funções carbonila ( $\nu_{\text{C=O}}$   $1614\text{ cm}^{-1}$ ) e fenol ( $\nu_{\text{C-O}}$   $1254\text{ cm}^{-1}$ ).



**10**

#### 5.1.7. 5,7,4'-Trihidroxiflavona (11)

O composto **11** foi prontamente identificado como [5,7-dihidroxi-2-(4'-hidroxifenil)]-4*H*-1-benzopiran-4-ona ou simplesmente 5,7,4'-trihidroxiflavona. Este flavonóide, denominado apigenina, é frequentemente encontrado em espécies vegetais e está sendo descrita pela primeira vez como constituinte químico do gênero *Polygala*. Tal substância natural foi isolada da fração solúvel em acetato de etila sob a forma de um sólido amorfo amarelo de ponto de fusão 344-345 °C.

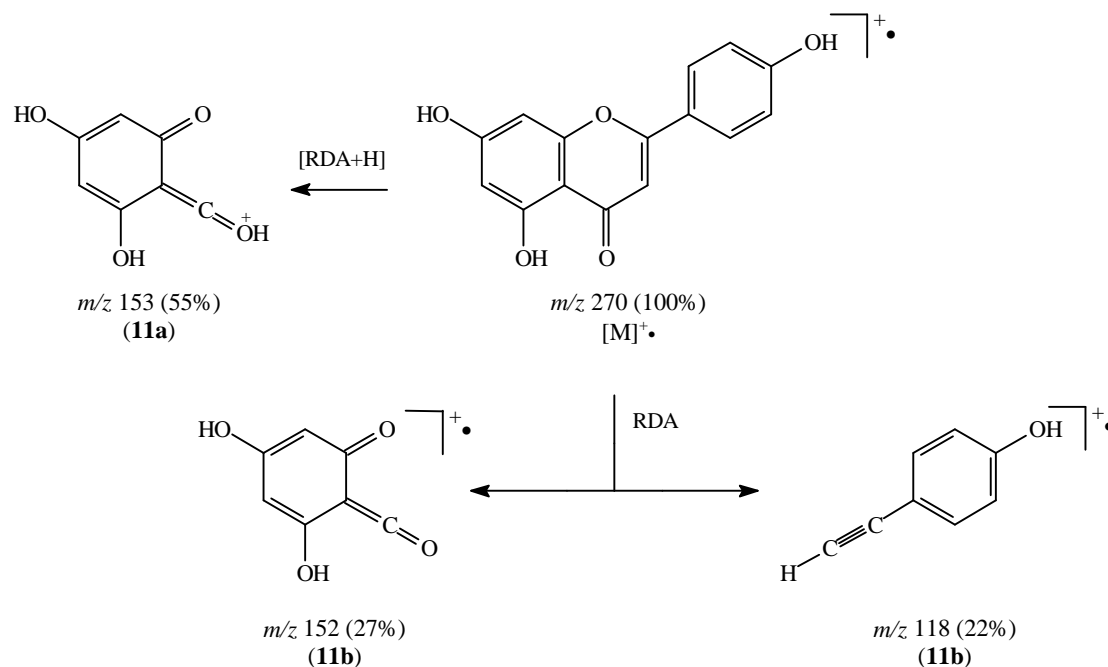


**11**

Primeiramente, em seu espectro de I.V. foram observadas absorções relacionadas aos grupos hidroxilas ( $\nu_{\text{máx}}$  3412  $\text{cm}^{-1}$ ), aos sistemas aromáticos ( $\nu_{\text{máx}}$  1614, 1518 e 1502  $\text{cm}^{-1}$ ) e à função carbonila com alto grau de conjugação característica de flavonas ( $\nu_{\text{máx}}$  1652  $\text{cm}^{-1}$ ).

A unidade flavonoídica fundamental foi caracterizada como 5,7,4'-trihidroxiflavona a partir da análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$ . Nele foram reconhecidos os sinais de um sistema de *spin AB*, referente a dois átomos de hidrogênios que mantêm entre si relação *meta* e que foram atribuídos a H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6.23 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz) e H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  6.36 ppm, 1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz), os sinais de um padrão de acoplamento do tipo AA'XX', típico de anel benzênico *para*-disubstituído, atribuídos a H-2' e H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  7.40 ppm, 2H, *d*,  $J = 8.5$  Hz) e a H-3' e H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  6.85 ppm, 2H, *d*,  $J = 8.5$  Hz), e o sinal de um hidrogênio isolado atribuído a H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  8.11 ppm, *s*). O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  12.98 ppm é característico da hidroxila quelatogênica em anel de seis membros e que, conseqüentemente, indicou a presença do grupo —OH no membro C-5. Os sinais largos adicionais em  $\delta_{\text{H}}$  9.73 ppm e 8.52 ppm corresponderam às hidroxilas suportadas pelos átomos de carbono C-7 e C-4', respectivamente (Tabela 6).

O seu espectro de massas, obtido por impacto eletrônico a 70 eV, revelou o pico correspondente ao íon molecular de  $m/z$  270 u.m.a. (100%) como representante da fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ , que segundo o número de átomos de hidrogênio e carbono conferiu com um total de onze insaturações. Os três outros picos importantes, de  $m/z$  153 u.m.a. (55%), 152 u.m.a. (27%) e 118 u.m.a. (22%), puderam ser relacionados aos fragmentos iônicos **11a**, **11b**, **11c**, respectivamente, mostrados no Esquema V, que são característicos da decomposição de íons moleculares de agliconas flavonoídicas.



**Esquema V**

### 5.1.8. 3,5,7,3',4'-Pentahidroxiavona (12)

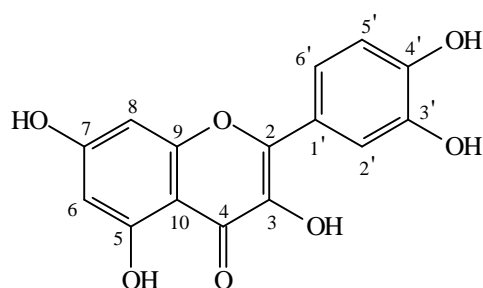
A 3,5,7,3',4'-pentahidroxiavona (**12**), freqüentemente chamada de quercetina, foi obtida da fração solúvel em acetato de etila sob a forma de um sólido amorfo amarelo com ponto de fusão 312-313°C. A ocorrência de tal substância em espécies vegetais é bastante comum; sua presença já foi constatada em duas espécies do gênero *Polygala*, no caso *P. caudata*<sup>(26)</sup> e *P. paniculata*. Algo de interessante acerca deste flavonol são os inúmeros trabalhos que descrevem muitas de suas propriedades terapêuticas, indicando que o composto ainda é considerado um eficiente e potencial agente farmacológico e biológico.

Na análise preliminar do espectro na região do infravermelho do composto **12** foram notadas, dentre outras, bandas de absorção características de deformações axiais dos tipos O—H ( $\lambda_{\text{máx}}$  3408 cm<sup>-1</sup>), C=C de anel aromático ( $\lambda_{\text{máx}}$  1614, 1518 e 1502 cm<sup>-1</sup>) e C=O  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $\lambda_{\text{máx}}$  1666 cm<sup>-1</sup>).

A ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  revelou um par de dupletos centrados em  $\delta_{\text{H}}$  6.42 ppm (1H) e  $\delta_{\text{H}}$  6.19 ppm (1H) com constante de acoplamento de hidrogênios *meta* correlacionados ( $J \approx 2.0$  Hz) e sinais para um sistema de *spin ABX* representado pelos sinais centrados em  $\delta_{\text{H}}$  7.67 ppm (1H, *d*,  $J = 1.98$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7.55 ppm (1H, *dd*,  $J = 1.98$  e  $J = 8.44$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6.89 ppm (1H, *d*,  $J = 8.48$  Hz, H-5'). O sinal singlete adicional que ocorreu neste espectro em  $\delta_{\text{H}}$  12.49 ppm é característico de hidroxila envolvida em ligação de hidrogênio intramolecular. Essas informações foram compatíveis com a estrutura de um flavonol que apresenta os seguintes padrões de substituição: 5,7-dihidroxi- para o anel A e 3',4'-dihidroxi para o anel B (Tabela 6).

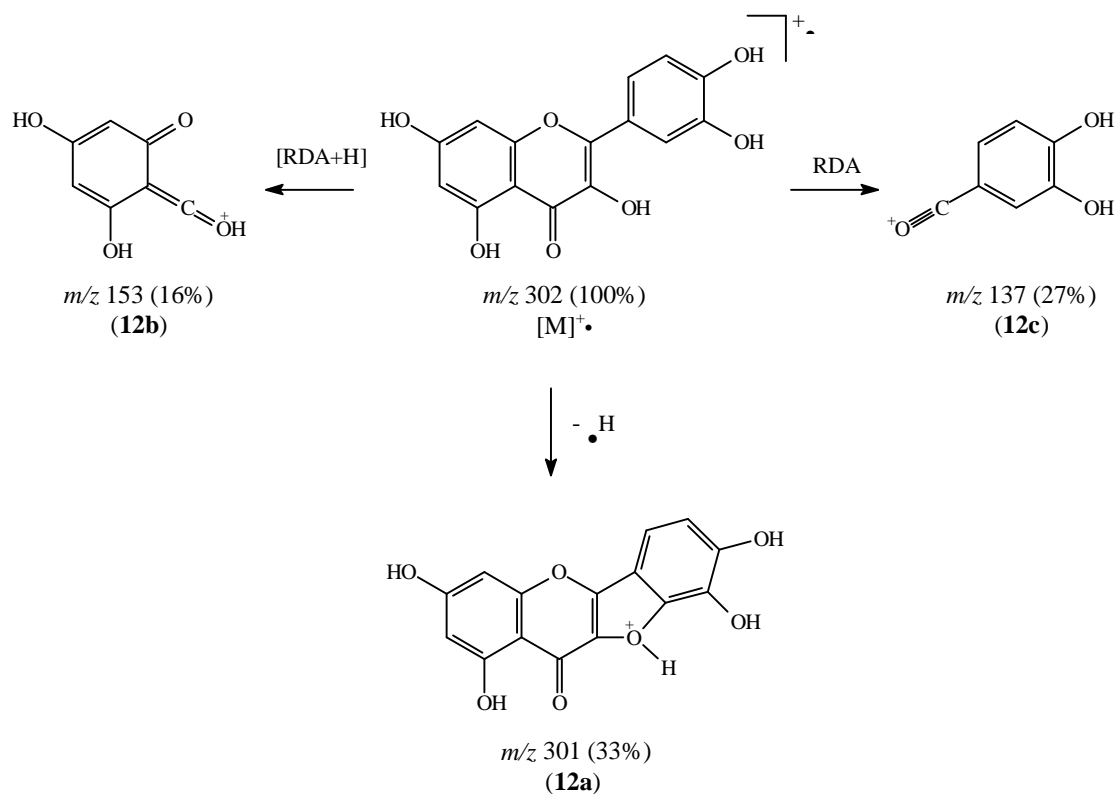
O dados espectroscópicos descritos anteriormente induziram à dedução da estrutura [5,7-dihidroxi-2-(3',4'-dihidroxifenil)]-4*H*-1-benzopiran-4-ona (quercetina) para o composto **12**.

A proposta estrutural foi reafirmada quando procedeu-se com a interpretação do espectro de massas, o qual exibiu íon molecular  $[\text{M}]^{+\bullet}$  de  $m/z$  302 u.m.a. (100%) como representante de uma fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ , que imediatamente indicou, segundo a relação entre átomos de hidrogênios e carbonos, um total de onze insaturações. Como complemento, observou-se picos de  $m/z$  301 u.m.a. (33%), 153 u.m.a. (16%) e 137 u.m.a. (27%) que foram associados aos fragmentos iônicos **12a**, **12b** e **12c**, respectivamente (Esquema VI).



**12**





**Esquema VI**

### 6.1.9. 3-O-( $\beta$ -D-glicopiranosil)-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona (**13**)

O flavonóide glicosilado 3-O-( $\beta$ -D-glicopiranosil)-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona (**13**), usualmente chamado de isoquercitrina, foi isolado anteriormente, por exemplo, das espécies vegetais *Hypericum perforatum*, *Gossypium herbaceum*, *Byrsonima variabilis*<sup>(64)</sup> e *Baccharis pseudotenuifolia*<sup>(65)</sup>, e agora este trabalho relata pela primeira vez a sua ocorrência no gênero *Polygala*.

Na região espectral do infravermelho o composto **13** apresentou intensa e larga banda de absorção relacionada às vibrações axiais de um conjunto de grupos hidroxilas ( $\lambda_{\text{máx}}$  3320  $\text{cm}^{-1}$ ), o que foi suficiente para evidenciar em primeira instância a natureza glicosídica desta substância. Outras absorções importantes apareceram em frequências

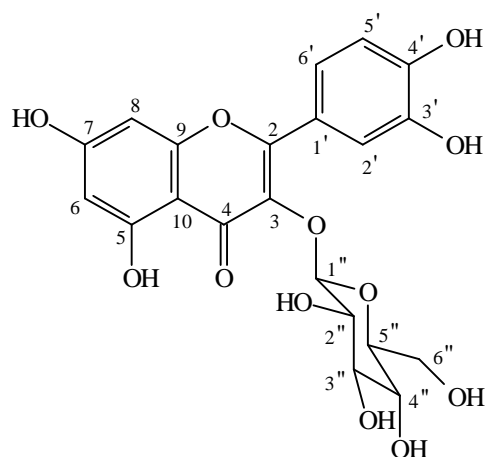
de estiramentos de ligações C=C de anel aromático ( $\nu_{\text{máx}}$  1606, 1562 e 1506  $\text{cm}^{-1}$ ) e C=O conjugada ( $\nu_{\text{máx}}$  1658  $\text{cm}^{-1}$ ).

A aglicona deste provável glicosídeo foi caracterizada como 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona com base na ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$ . No espectro foram observados os sinais de dois átomos de hidrogênio aromáticos que mantêm relação *meta* entre si ( $\delta_{\text{H}}$  6.42 ppm, 1H, *d*,  $J = 1.77$  Hz e  $\delta_{\text{H}}$  6.21 ppm, 1H, *d*,  $J = 1.79$  Hz) e um padrão de acoplamento característico de sistema tipo *ABX* identificado pelos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7.67 ppm (1H, *dd*,  $J = 1.99$  e  $J = 8.46$  Hz, H-6'),  $\delta_{\text{H}}$  7.55 ppm (1H, *d*,  $J = 1.98$  Hz, H-2') e  $\delta_{\text{H}}$  6.83 ppm (1H, *d*,  $J = 8.49$  Hz, H-5'). Dentre um dos sinais restantes foi detectado um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  5.38 (1H, *d*,  $J = 7.59$  Hz) característico de hidrogênio em carbono anomérico que é membro de resíduo glicosídeo, que segundo os valores de deslocamento químico e constante de acoplamento está suportado com configuração  $\beta$  por um heteroátomo da estrutura central. Até este momento suspeitava-se que o composto **13** era um derivado monoglicosilado da quercetina.

Com o auxílio do espectro de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ , os vinte e um átomos de carbono contabilizados a partir dos sinais da ressonância magnética nuclear de carbono-13 sem acoplamento foram reconhecidos como um carbonílico, sete  $sp^2$  oxigenados, cinco  $sp^2$  metínicos, dois  $sp^2$  quaternários, um  $sp^3$  dioximetínico, quatro  $sp^3$  oximetínicos e um oximetilênico. Esses dados sustentaram a idéia de uma unidade flavonoídica pentaoxigenada e, acima de tudo, confirmaram a sua associação, através de uma *O*-substituição, com um radical glicopiranosila. Quando comparados os valores de  $\delta_{\text{C}}$  desta amostra com os da quercetina livre<sup>(66)</sup> percebeu-se que, principalmente, os átomos de carbono C-2, C-3 e C-4 passaram a sofrer uma significativa influência em suas densidades eletrônicas devido a presença do glicosídeo (C-2:  $\Delta\delta_{\text{C}} \approx +10$  ppm; C-3:  $\Delta\delta_{\text{C}} \approx -2$  ppm; C-4:  $\Delta\delta_{\text{C}} \approx +2$  ppm — valores de  $\Delta\delta_{\text{C}}$  em relação a quercetina livre). Tal efeito foi considerado o mais importante argumento para localizar o açúcar no átomo de oxigênio sustentado pelo carbono C-3 da aglicona 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona.

Finalmente, a substância natural **13** foi definida como [3-*O*-( $\beta$ -D-glicopiranosil)-5,7-dihidroxi-2-(3',4'-dihidroxifenil)]-4*H*-1-benzopiran-4-ona ou simplesmente 3-*O*-( $\beta$ -D-glicopiranosil)-quercetina. A confirmação da estrutura foi obtida a partir do confronto dos valores de  $\delta_{\text{C}}$  da amostra com os descritos na literatura<sup>(58)</sup>. Neste caso, a análise comparativa por cromatografia em camada delgada com um padrão autêntico do

glicosídeo também foi uma prova decisiva para aprovação da proposta estrutural assumida.



### **13**

Quando a amostra foi submetida a um feixe eletrônico de energia de 70 eV obteve-se um espectro de massa que não apresentou o pico correlacionado ao íon molecular  $[M]^{+\bullet}$  ( $m/z$  464 u.m.a.), porém exibiu pico base de  $m/z$  302 u.m.a. como representante da unidade aglicona quercetina de fórmula molecular  $C_{15}H_{10}O_7$ . Os outros picos importantes foram facilmente relacionados aos mesmos fragmentos iônicos do composto **12** mostrados no Esquema VI [301 u.m.a. (27%) (**12a**), 153 u.m.a. (12%) (**12b**), 137 u.m.a. (17%) (**12c**)].

**Tabela 6.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) dos compostos **11-13**. Deslocamentos químicos,  $\delta$ , em ppm e constantes de acoplamento,  $J$  (entre parênteses), em Hz.

<b>H</b>	<b>11 (acetona-<math>d_6</math>)</b>	<b>12 (DMSO-<math>d_6</math>)</b>	<b>13 (DMSO-<math>d_6</math>)</b>
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>3</b>	8.11 ( <i>s</i> )	-	-
<b>6</b>	6.23 ( <i>d</i> , 2.06)	6.19 ( <i>d</i> , 1.86)	6.21 ( <i>d</i> , 1.79)
<b>8</b>	6.36 ( <i>d</i> , 2.06)	6.42 ( <i>d</i> , 1.77)	6.42 ( <i>d</i> , 1.77)
<b>2'</b>	7.40 ( <i>d</i> , 8.54)	7.67 ( <i>d</i> , 1.98)	7.55 ( <i>d</i> , 1.98)
<b>3'</b>	6.85 ( <i>d</i> , 8.56)	-	-
<b>5'</b>	6.85 ( <i>d</i> , 8.56)	6.89 ( <i>d</i> , 8.48)	6.83 ( <i>d</i> , 8.49)
<b>6'</b>	7.40 ( <i>d</i> , 8.54)	7.55 ( <i>dd</i> , 1.98, 8.44)	7.67 ( <i>dd</i> , 1.99, 8.46)
<b>1''</b>	-	-	5.38 ( <i>d</i> , 7.59)
OH	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>5</b>	12.98 ( <i>s</i> )	12.49 ( <i>s</i> )	12.60
<b>7</b>	8.52 ( <i>s</i> )	-	-
<b>4'</b>	9.73 ( <i>s</i> )	-	-

## 5.2. Ensaios Biológicos

Conjugado aos trabalhos de prospecção fitoquímica convencional, foram promovidos ensaios biológicos para avaliação prévia das atividades tripanomicida e antinociceptiva do extrato bruto, frações solúveis e compostos da espécie vegetal *Polygala sabulosa* (Polygalaceae).

### 5.2.1. Atividade tripanomicida

Como descrito na seção experimental os ensaios biológicos para avaliação da atividade tripanomicida procederam em meio de cultura contra as formas epimastigota e tripomastigota sangüínea de *Trypanosoma cruzi*. Os resultados mais promissores são mostrados nas Tabelas 7, 8 e 9.

**Tabela 7.** Efeito do extrato bruto e frações solúveis ensaiados frente à forma epimastigota de *T. cruzi*.

Amostra*	DL <sub>50</sub> (µg/mL)
EB	5
FH	1
FDCM	5
FAE	10
FE	Inativa

\* EB: extrato bruto; FH: fração solúvel em hexano obtida no pré-fracionamento B; FDCM: fração solúvel em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> obtida no pré-fracionamento B; FAE: fração solúvel em AcOEt obtida no pré-fracionamento B; FE: fração em EtOH obtida no pré-fracionamento A. (Ver Fluxograma 1, pág. 54)

**Tabela 8.** Efeito do extrato bruto e frações solúveis ensaiados frente à forma tripomastigota sanguínea de *T. cruzi*.

Amostra*	% de redução			
	500 (µg/mL)	250 (µg/mL)	100 (µg/mL)	50 (µg/mL)
<b>EB</b>	100 <sup>++</sup>	-	100 <sup>++</sup>	100 <sup>++</sup>
<b>FH</b>	32 <sup>+</sup>	16 <sup>+</sup>	-	-
<b>FDCM</b>	100 <sup>+</sup>	100 <sup>+</sup>	-	-
<b>FAE</b>	63	58	-	-
<b>Violeta de genciana</b>	100	100	-	-
<b>DMSO 5%</b>	0	0	-	-
<b>LIT</b>	0	0	-	-

<sup>+</sup> baixo nível de hemólise dos eritrócitos; <sup>++</sup> alto nível de hemólise dos eritrócitos;

\* EB: extrato bruto; FH: fração solúvel em hexano obtida no pré-fracionamento B; FDCM: fração solúvel em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> obtida no pré-fracionamento B; FAE: fração solúvel em AcOEt obtida no pré-fracionamento B; (Ver Fluxograma 1, pág. 54)

**Tabela 9.** Efeito dos compostos **1**, **2** e **4** isolados de *P. sabulosa* ensaiados frente à forma de cultura epimastigota de *T. cruzi*.

Composto	% de Inibição					DL <sub>50</sub> µg/mL
	50 µg/mL	25 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	1 µg/mL	
<b>1</b>	100	100	100	68	43	0,37
<b>2</b>	100	100	100	51	35	0,50
<b>4</b>	100	100	100	85	18	0,44
<b>Rochagan<sup>®</sup></b>	100	76	-	-	-	-

Esses números revelaram que o extrato bruto e as frações solúveis apresentaram significativa capacidade de inibição do desenvolvimento do protozoário *T. cruzi*, contudo, alguns casos foram acompanhados por ação hemolítica sobre os eritrócitos. Satisfatoriamente, condição de inibição ainda melhor foi oferecida pelo fitoesterol (**1**), pela cumarina-hemiterpênica (**2**) e pela dihidroestiril-lactona (**4**) isolados da fração solúvel em diclorometano, e agora passam a ser vistos como possíveis candidatos a modelos para agentes antichagásicos; neste caso nada ainda sobre a ação hemolítica foi examinado.

### **5.2.2. Atividade antinociceptiva**

A avaliação das propriedades antinociceptiva do extrato bruto, frações solúveis e de quatro compostos isolados (**3**, **4**, **5** e **9**) na nocicepção química induzida pela injeção de ácido acético em camundongos forneceu os resultados apresentados nas Figuras 25 e 26.

Em relação ao grupo de controle, percebeu-se que a administração pela via intraperitoneal de todos os elementos testados causou redução, de forma significativa e dependente da dose, das contorções abdominais em camundongos induzidas pela injeção de ácido acético a 0,6%, ou seja, tanto o extrato bruto quanto suas frações e substâncias puras apresentaram um pronunciado efeito analgésico. Tal observação revelou que a espécie vegetal *P. sabulosa* também é uma fonte potencial de substâncias com ação antinociceptiva e apontou as estiril-lactonas **3**, **4**, **5** e **9** como candidatos a novos compostos-modelos para fármacos analgésicos.



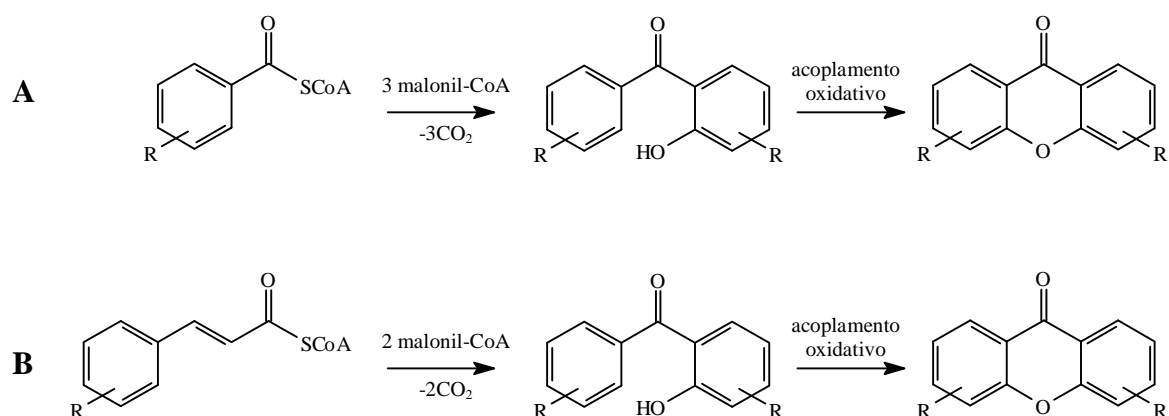




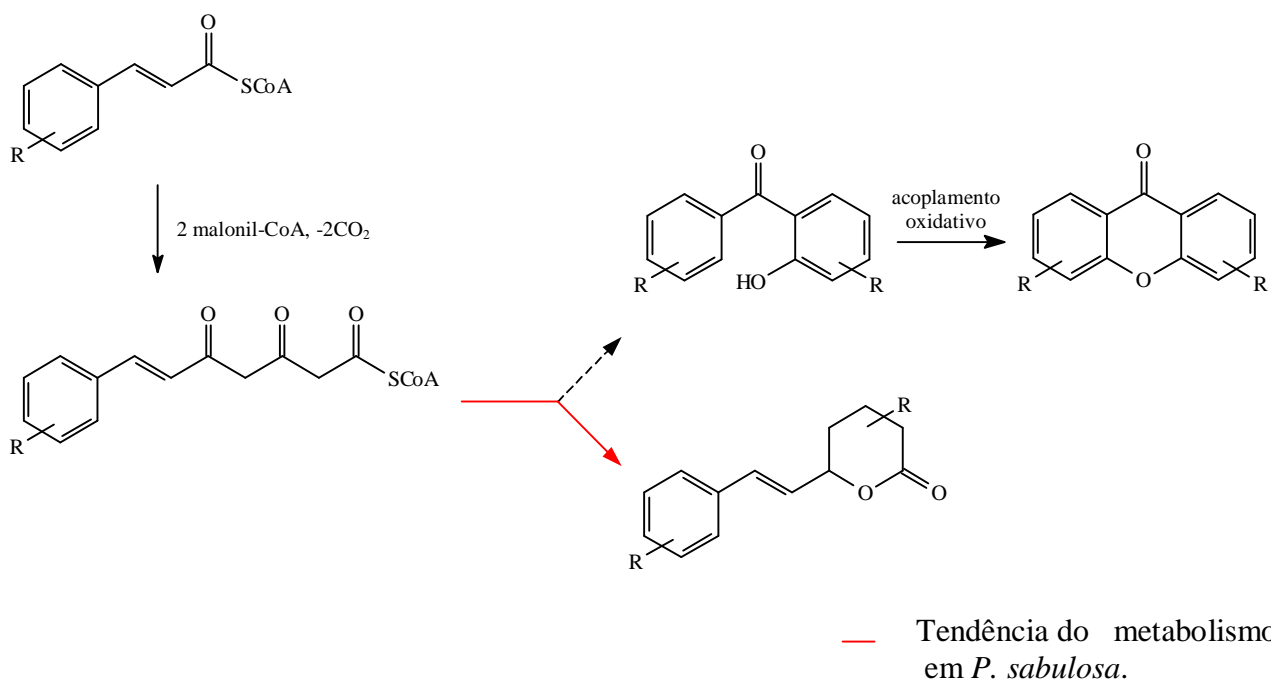
## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final do estudo fitoquímico sistemático de *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (Polygalaceae) algumas informações de relevante significado quimiotaxonômico e biossintético puderam ser enumeradas.

i) Constatou-se a ausência de xantonas nesta espécie vegetal. Por outro lado, observou-se um grande acúmulo de dihidroestiril- e estiril-pironas, situando *P. sabulosa* (até o presente momento) como a única espécie do gênero que biossintetiza estiril-lactonas no lugar de xantonas, fato que não confirma a sua similaridade química e o seu alinhamento quimiotaxonômico no gênero. Mas como, então, explicar este comportamento anômalo com respeito ao metabolismo de seus marcadores quimiotaxonômicos? Sabe-se que as xantonas são biossintetizadas a partir da condensação de derivados do ácido benzóico ( $C_6-C_1$ ) com três equivalentes de malonil-CoA (Esquema I-A). Entretanto, há uma rota alternativa (pouco citada), formulada por Fugita e Inoue<sup>(74)</sup>, que também leva à compostos xantonóides. Estes autores demonstraram com a realização de experimentos envolvendo marcação isotópica que a 1,3,6,7-tetrahidroxixantona é biossintetizada a partir da condensação do ácido *p*-cumárico com duas moléculas de malonil-CoA, e assim propuseram que as xantonas podem derivar da condensação de uma unidade  $C_6-C_3$  com duas unidades de acetato (Esquema I-B), ao invés de serem produtos da condensação de um fragmento  $C_6-C_1$  com três de acetato. Mais tarde, Ghosal e col.<sup>(38)</sup>, com o intuito de explicar certos padrões de oxigenação em xantonas de algumas espécies do gênero *Polygala*, defenderam a tese de que xantonas de Polygalas são biossintetizadas através da condensação de fragmentos  $C_6-C_3$  com duas unidades de malonil-CoA. Considerando que as estiril-pironas também são provenientes da condensação de um precursor  $C_6-C_3$  com duas unidades de acetato, similarmente a proposta de Fugita e Inoue<sup>(66)</sup> para xantonas, podemos postular que estiril-pironas e xantonas de *Polygala* derivam de um policetídeo comum como intermediário-chave, conforme ilustrado no Esquema II. Portanto, este fato poderia explicar a possibilidade de um fenômeno de desvio metabólico em *P. sabulosa* que resulta na produção de estiril-lactonas.



**Esquema I**



**Esquema II**

ii) O fitoesterol  $\alpha$ -espinasterol (**1**), menos freqüente em espécies vegetais, desponta como um constituinte marcante em plantas do gênero *Polygala* distribuídas em território catarinense, considerando-se que a grande maioria das espécies vegetais apresentam o

$\beta$ -sitosterol como esteroide mais comum. O composto  $\alpha$ -espinasterol ocorre nas três espécies estudadas da flora local (*P. cyparissias*, *P. paniculata* e *P. sabulosa*).

iii) Além disso, a espécie *P. sabulosa* caracterizou-se pela presença de flavonas, de onde foram isoladas e identificadas apigenina (**11**), quercetina (**12**) e 3-O-( $\beta$ -D-glicopiranosil)-quercetina (**13**).

No que se refere a atividade biológica, o extrato bruto, frações solúveis e compostos isolados de *P. sabulosa* foram avaliados através dos modelos de atividade tripanomicida e nocicepção em camundongos. Os ensaios biológicos indicaram que esta espécie vegetal apresenta um potencial efeito tripanomicida quando testado em formas de cultura epimastigota e tripomastigota sanguínea de *Trypanosoma cruzi* (Tabelas 7 e 8). Os resultados evidenciaram ainda que os compostos puros **1**, **2** e **4** são, em parte, os responsáveis por tal atividade (DL<sub>50</sub> de 0,37  $\mu$ g/mL para **1**, 0,50  $\mu$ g/mL para **2** e 0,44  $\mu$ g/mL para **4**). Também foi observada uma significativa atividade na nocicepção química induzida pelo ácido acético em camundongos por parte do extrato bruto, frações solúveis e os compostos **3**, **4**, **5** e **9** (Fig. 25 e 26). Considerando que algumas das substâncias ativas identificadas ocorrem em quantidades apreciáveis, a planta “timuto-pinheirinho” pode ser colocada em posição de destaque como uma fonte natural para estudos mais avançados de atividade farmacológica com potencial valor na terapia alternativa.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] GEISSMAN, T. A., CROUT, D. H. G. **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**. San Francisco: Freeman, Cooper & Company, 1969. 592 p.
- [2] TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1991. 565 p.
- [3] SALISBURY, F. B., ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4<sup>a</sup> ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682 p.
- [4] METZLER, D. E. **Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells**. New York: Academic Press, 1977. 1128 p.
- [5] ROBINSON, T. **The Organic Constituents of Hight Plants**. 4<sup>a</sup> ed. North Amherst: Cordus Press, 1980. 352 p.
- [6] DOMÍNGUEZ, X. A. **Métodos de Investigación Fitoquímica**. México: Editorial Limusa, 1979. 281 p.
- [7] BARRETO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. *Química Nova*, v. 13, n. 1, p. 29-39, 1990.
- [8] CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- [9] MONTANARI, C. A., BOLZANI, V. da S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

- [10] YUNES, R. A., PEDROSA, R. C., CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.
- [11] HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between Phytochemistry and Medicine. *Phytochemistry*, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.
- [12] NISHIMURA, H., NAKAMURA, T., MIZUTANI, J. Allelopathic effects of *p*-methane-3,8-diols in *Eucalyptus citriodora*. *Phytochemistry*, v. 23, n. 12, p. 2777-2779, 1984.
- [13] MATA, R., MACÍAS, M. L., ROJAS, I. S., LOTINA-HENNSSEN, B., TOSCANO, R. A., ANAYA, A. L. Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 2, p. 441-449, 1998.
- [14] PERES, M. T. L. P., PIZZOLATTI, M. G., QUEIROZ, M. H., YUNES, R. A. Potencial de atividade alelopática de *Gleichenia pectinata* Willd (Pr.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 33, n. 2, p. 131-137, 1998.
- [15] CRUZ, M. E. da S., NOZAKI, M. de H., BATISTA, M. A. Plantas medicinais e alelopatia. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento* [on-line] [Acessado em 17 de junho de 2001]. Disponível na Internet em <[http://www.biotecnologia.com.br/bio/bio/15/15\\_e.htm](http://www.biotecnologia.com.br/bio/bio/15/15_e.htm)>.
- [16] PIRES, N. de M., PRATES, H. T., PEREIRA FILHO, I. A., OLIVEIRA JUNIOR, R. S., de FARIA, T. C. L. Atividade alelopática da leucena sobre espécies de plantas daninha. *Scientia Agrícola* [on-line] v. 58, n. 1, p. 61-65 , 2001.
- [17] STUESSY, T. F. **Plant Taxonomy. The Systematic Evaluation of Comparative Data**. New York: Columbia University Press, 1990. 514 p. p. 329-349.

- [18] STACE, C. A. **Plant Taxonomy and Biosystematics**. 2<sup>a</sup> ed. Cambridge: University Press, 1989. 264 p. p. 86-108.
- [19] SWAIN, T. **Comparative Phytochemistry**. London: Academic Press, 1966. 360 p.
- [20] BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. *Química Nova*, v. 17, n. 5, p. 405-445, 1994.
- [21] ZOMLEFER, W. B. **Guide to Flowering Plant Families**. 5<sup>a</sup> ed. Chapel Hill: The University of North Carolina Press, 1994. 430 p., p. 143-145.
- [22] WURDACK, J. J., SMITH, L. B. **Flora Ilustrada Catarinense. Poligoláceas**. Itajaí: Tipografia e Livraria Blumenauense S.A., 1971. 70 p., p. 3-52.
- [23] ZHANG, D., MIYASE, T., KUROYANAGI, M., UMEHARA, K., NOGUCHI, H. Polygalasaponins XLII-XLVI from roots of *Polygala glomerata*. *Phytochemistry*, v. 47, n. 3, p. 459-466, 1998.
- [24] KAKO, M., MIURA, T., NISHIYAMA, Y., ICHIMARU, M., MORIYASU, M., KATO, A. Hypoglycemic activity of some triterpenoid glycosides. *Journal of Natural Products*, v. 60, n. 6, p. 604-605, 1997.
- [25] CRISTIANO, R., BRANCO, A., PIZZOLATTI, M. G. Identificação de uma xantona e dois esteróis como constituintes minoritários de *Polygala paniculata* por CGAR-EM. In: IX Encontro de Química da Região Sul, 2001, Londrina. Livro de Resumos, Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2001. QO-046.
- [26] LI, W., CHAN, C., LEUNG, H., YEUNG, H., XIAO, P. Xanthones from *Polygala caudata*. *Phytochemistry*, v. 51, n. 7, p. 953-958, 1999.

- [27] CUNHA JUNIOR, A., PEREIRA, W. S., PIZZOLATTI, M. G., STEINDEL, M., GRISARD, E., KOGA, A. H., DELLE MONACHE, F. Estudo fitoquímico da espécie vegetal *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) e avaliação da atividade tripanomicida. In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002, Poços de Caldas. Livro de Resumos: SBQ, 2002. PN-107.
- [28] BASHIR, A., HAMBURGER, M., MSONTHI, D. J., HOSTETTMANN, K. Isoflavones and xanthones from *Polygala virgata*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 1, p. 309-311, 1992.
- [29] JUNG, K. Y., DO, J. C., SON, K. H. Kaempferol 3-*O*-[6''-*O*-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)glucoside] from leaves of *Polygala japonica*. *Phytochemistry*, v. 34, n. 4, p. 1196-1197, 1993.
- [30] HAMBURGER, M., GUPTA, M., HOSTETTMANN, K. Coumarines from *Polygala paniculata*. *Planta Medica*, v. 51, n. 3, p. 215-217, 1985.
- [31] PIZZOLATTI, M. G., LUCIANO, C., DELLE MONACHE, F. Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrones derivatives from *Polygala sabulosa*. *Phytochemistry*, v. 55, n. 7, p. 819-822, 2000.
- [32] HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K. Hydroxycinnamic acid esters from *Polygala chamaebuxus*. *Phytochemistry*, v. 24, n. 8, p. 1793-1797, 1985.
- [33] BASHIR, A., HAMBURGER, M., MSONTHI, J. D., HOSTETTMANN, K. Sinapic acid esters from *Polygala virgata*. *Phytochemistry*, v. 32, n. 3, p. 741-745, 1993.
- [34] ZHANG, D., MIYASE, T., KUROYANAGI, M., UMEHARA, K., NOGUCHI, H. Oligosaccharide polyesters from roots of *Polygala fallax*. *Phytochemistry*, v. 45, n. 4, p. 733-741, 1997.



- [35] ZHANG, D., MIYASE, T., KUROYANAGI, M., UMEHARA, K., NOGUCHI, H. Oligosaccharide polyesters from roots of *Polygala glomerata*. *Phytochemistry*, v. 47, n. 1, p. 45-52, 1998.
- [36] KOBAYASHI, W., MIYASE, T., SUZUKI, S., NOGUCHI, H., CHEN, X. Tetrasaccharide multi-esters and xanthone glycosides from the roots of *Polygala wattersii*. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 8, p. 1121-1126, 2000.
- [37] KOBAYASHI, W., MIYASE, T., SUZUKI, S., NOGUCHI, H., CHEN, X. Oligosaccharide esters from roots of *Polygala arillata*. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 8, p. 1066-1069, 2000.
- [38] GHOSAL, S., BASUMATARI, P. C., BANERJEE, S. 1,2,3-Trioxxygenated glucosyloxyxanthenes from *Polygala triphylla*. *Phytochemistry*, v. 20, p. 489-492, 1981.
- [39] PINHEIRO, T. R., CECHINEL, V., SANTOS, A. R. S., CALIXTO, J. B., DELLE MONACHE, F., PIZZOLATTI, M. G., YUNES, R. A. Three Xanthenes from *Polygala cyparissias*. *Phytochemistry*, v. 48, n. 4, p. 725-728, 1998.
- [40] MARSTON, A., HAMBURGER, M., SORDAT-DISERENS, I., MSONTHI, J. D., HOSTETTMANN, K. Xanthenes from *Polygala nyikensis*. *Phytochemistry*, v. 33, n. 4, p. 809-812, 1993.
- [41] CRISTIANO, R., BRANCO, A., PIZZOLATTI, M. G., REZENDE, C. M., DELLE MONACHE, F. Duas novas xantonas de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae). In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002, Poços de Caldas. Livro de Resumos: SBQ, 2002. PN-108.
- [42] IKEYA, Y., SUGAMA, K., OKADA, M., MITSUHASHI, H. Two xanthenes from *Polygala tenuifolia*. *Phytochemistry*, v. 30, n. 6, p. 2061-2065, 1991.
- [43] FUJITA, T., LIU, D., UEDA, S., TAKEDA, Y. Xanthenes from *Polygala tenuifolia*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 11, p. 3997-4000, 1992.

- [44] JIANG, Y., TU, P. Xanthone *O*-glycosides from *Polygala tenuifolia*. *Phytochemistry*, v. 60, n. 8, p. 813-816, 2002.
- [45] a) BLÁZQUEZ, M. A., BERMEJO, A., ZAFRA-POLO, M. C., CORTES, D. Styryl-lactones from *Goniothalamus species* — A review. *Phytochemical Analysis*, v. 10, p. 161-170, 1999. b) BERMEJO, A., BLÁZQUEZ, M. A., RAO, K. S., CORTES, D. Styryl-lactones from the stem bark of *Goniothalamus arvensis*. *Phytochemical Analysis*, v. 10, p. 127-131, 1999.
- [46] SMITH, R. M. Kava lactones in *Piper methysticum* from Fiji. *Phytochemistry*, v. 22, n. 4, p. 1055-1056, 1983.
- [47] SAM, T. W., SEW-YEU, C., MATSJEH, S., GAN, E.K., RAZAK, D., MOHAMED, A. L. Goniothalamine oxide: an embryotoxic compound from *Goniothalamus macrophyllus* (Annonaceae). *Tetrahedron Letters*, v. 28, n. 22, p. 2541-2544, 1987.
- [48] WU, Y., CHANG, F., DUH, C., WANG, S., WU, T. Cytotoxic styrylpyrones of *Goniothalamus amuyon*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 8, p. 2851-2853, 1992.
- [49] VEIT, M., GEIGER, H., WRAY, V., ABOU-MANDOUR, A., ROZDZINSKI, W., WITTE, L., STRACK, D., CZYGAN, F. Equisetumpyrone, a styrylpyrone glucoside in gametophytes from *Equisetum arvense*. *Phytochemistry*, v. 32, n. 4, p. 1029-1032, 1993.
- [50] VEIT, M., GEIGER, H., KAST, B., BECKERT, C., HORN, C., MARKHAM, K. R., WONG, H., CZYGAN, F. Styrylpyrone glucosides from *Equisetum*. *Phytochemistry*, v. 39, n. 4, p. 915-917, 1995.
- [51] a) BECKERT, C., HORN, C., SCHNITZLER, J. P., LEHNING, A., HELLER, W., VEIT, M. Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum*. *Phytochemistry*, v. 44, n. 0, p. 275-283, 1996. b) HERDERICH, M., BECKERT, C., VEIT, M. Establishing styrylpyrone synthase activity in cell free extracts obtained from

- gametophytes of *Equisetum arvense* L. by high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, v. 8, p. 194-197, 1997.
- [52] BRODGEN, P. J., GABBUTT, C. D., HEPWORTH, J. D. Pyrans and fused pyrans. (i) Structure. **Comprehensive Heterocyclic Chemistry**. A. J. Boulton and A. McKillop. Oxford: Pergamon Press, 1984. 1210 p., v. 3, 2B, p. 573-645.
- [53] NORRIS, C. L., BENSON, R. C., BEAK, P., FLYGARE, W. H. Microwave spectrum of 2-pyrone and the molecular Zeeman effect in tropone, 2-pyrone and 4-pyrone. Suppression of nonlocal contributions to the out-of-plane molecular magnetic susceptibilities by the insertion of a carbonyl group into an aromatic ring. *Journal of the American Chemical Society*, v. 95, n. 9, p. 2766-2772, 1973.
- [54] REY, L. **Parasitologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1991. 731 p., p. 128-169.
- [55] PIZZOLATTI, M. G., PEREIRA, W. S., DELLE MONACHE, F., STEINDEL, M., KOGA, A. H., GRISARD, E. Constituintes químicos e potencial atividade tripanosomicida de *Polygala sabulosa* A. W. Bennet (Polygalaceae). In: XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2000, Recife. Livro de Resumos: UFPE, 2002. QU-038.
- [56] RANG, H. P., DALE, M. M. **Farmacologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1993. 595 p., p. 431-445.
- [57] COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Ed. da Universidade Estadual de Campinas, 1993. 279 p., p. 59-70.

- [58] MARKHAM, K. R., TERNAI, B., STANLEY, R., GEIGER, H., MABRY, T. J. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III (Naturally occurring flavonoid and their acylated derivatives). *Tetrahedron*, v. 34, p. 1389-1397, 1978.
- [59] KOJIMA, H., SATO, N., HATANO, A., OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, v. 29, n. 7, p. 2351-2355, 1990.
- [60] CARDONA, L., GARCÍA, B., PEDRO, J. R., PÉREZ, J. 6-Prenyloxy-7-methoxycoumarin, a coumarin-hemiterpene ether from *Carduus tenuiflorus*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 11, p. 3989-3991, 1992.
- [61] SCHLEMMER, F., HUGEL, H., PETRI, H. R., KUHLMEY, S. R. Pharmakognostische charakterisierung von *Piper sanctum*. *Deutsche Apotheker-Zeitung*, v. 112, p. 591-596, 1972.
- [62] SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 1994. 387 p.
- [63] a) ROSSI, M. H., YOSHIDA, M., MAIA, J. G. S. Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from an *Aniba* species. *Phytochemistry*, v. 45, n. 6, p. 1263-1269, 1997. b) BARBOSA FILHO, J. M., YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O. R., BARBOSA, R. C. S. B., GIESBRECHT, A. M., YOUNG, C. M. Benzoyl esters, amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry*, v. 26, n. 9, p. 2615, 1987.
- [64] ARAGÃO, P. C de A., de TOLEDO, J. B., MORAIS, A. A., BRAZ-FILHO, R. Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. *Química Nova*, v. 13, n. 4, p. 254-259, 1990.
- [65] MOREIRA, F. de P. M. Estudo fitoquímico de *Baccharis pseudotenuifolia*, *Baccharis lingustrina* e *Baccharis platypoda* e avaliação do potencial antimicrobiano. Dissertação (M. Sc.), Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. 142 p.

- [66] FUJITA, M., INOUE, T. Biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides*: intact incorporation of C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> precursor into xanthone. *Tetrahedron Letters*, v. 18, n. 51, p. 4503-4506, 1977.
- [67] MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: EUFC, 1988. 126 p.
- [68] LEHNINGER, A. L. Biossíntese e a utilização da energia das ligações de fosfato. **Bioquímica**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1976. 608 p.